

Alba Regina de Abreu Lima Catelani

Estudo Citogenético de Aedes (Stegomyia)
Aegypti e Aedes (Finlaya) Fluviatilis



ALBA REGINA DE ABREU LIMA CATELANI

**Estudo Citogenético de *Aedes (Stegomyia) aegypti*
e *Aedes (Finlaya) fluviatilis*.**

Dissertação apresentada para a obtenção do
Grau de Mestre em Genética no Curso de Pós
Graduação em Ciências Biológicas, Área de
Concentração em Genética, do Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista "Julio de
Mesquita Filho", UNESP.



565/92

São José do Rio Preto
São Paulo
1991



Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP, no município de São José do Rio Preto, SP.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo

Este trabalho foi realizado no Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"- UNESP, com auxílio-bolsa da CAPES.

"Se vi mais longe, foi por estar
em cima das nuvens de
gigantes."

Sr. Isaac Newton



Ao Wilton, que vivenciou todas as
fases desta investigação, com
muito carinho, interesse, estímulo
e "Se vi mais longe, foi por ter-
me colocado nos ombros de
gigantes." Agradecimentos ao seu
trabalho.

Sir. Isaac Newton

Dedicado...



A Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara

Ao Wilton, que vivenciou todas as
fases desta investigação, com
muito carinho, interesse, estímulo
e inestimável ajuda,

Aos meus pais, Albano e Arléti,
que me formaram com seu amor e
trabalho,

Dedico...



INDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1. Espécies Utilizadas.....	25
2. Origem das Amostras Analisadas.....	25
3. Manutenção das Amostras no Laboratório.....	26
4. Preparações Citológicas.....	26
4.1. Esmagamento e coloração com orceína lacto-acética.....	27
4.2. Coloração com nitrato de prata.....	28
5. Fotomicrografias.....	29
6. Análise Estatística dos Dados.....	29
III. RESULTADOS.....	30
1. Coloração com Orceína Lacto-Acética.....	30
1.1. <i>Aedes aegypti</i>	30
A. Gânglios cerebrais.....	30
B. Testículo de pupa e gônada de larva.....	33
1.2. <i>Aedes fluviatilis</i>	44
A. Gânglios cerebrais.....	44
B. Testículos.....	44
1.3. Núcleos interfásicos.....	44
2. Coloração com Nitrato de Prata.....	44
A. Túbulos de Malpighi.....	44
B. Gânglios Cerebrais.....	47
C. Testículos.....	49
IV. DISCUSSÃO.....	64
V. RESUMO.....	66
VI. SUMMARY.....	72
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
VIII. AGRADECIMENTOS.....	103

À Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara
de Campos Bicudo, pelo convívio
amigo, dedicação e entusiasmo com
que me orientou, intensificando em
mim o amor pela ciência e
pesquisa,
o meu muito e especial obrigado.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
1. Espécies Utilizadas.....	25
2. Origem das Amostras Analisadas.....	25
3. Manutenção das Amostras no Laboratório.....	26
4. Preparações Citológicas.....	26
4.1. Esmagamento e coloração com orceína lacto-acética.....	27
4.2. Coloração com nitrato de prata.....	28
5. Fotomicrografias.....	29
6. Análise Estatística dos Dados.....	29
III. RESULTADOS.....	30
1. Coloração com Orceína Lacto-Acética.....	30
1.1. Aedes aegypti	30
A. Gânglios cerebrais.....	30
B. Testículo de pupa e gônada de larva.....	33
1.2. Aedes fluviatilis	44
A. Gânglios cerebrais.....	44
B. Testículos.....	44
1.3. Núcleos interfásicos.....	55
2. Coloração com Nitrato de Prata.....	58
A. Túbulos de Malpighi.....	58
B. Gânglios Cerebrais.....	59
C. Testículos.....	59
IV. DISCUSSÃO.....	64
V. RESUMO.....	86
VI. SUMMARY.....	90
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
VIII. AGRADECIMENTOS.....	105

I. INTRODUÇÃO

O gênero **Aedes** (Diptera, Culicidae) inclui espécies de grande interesse sanitário por serem responsáveis pela veiculação de agentes patogênicos ao homem e animais. O gênero é dividido em numerosos subgêneros, com distribuição mundial. Foram encontradas, nas Américas, espécies de **Aedes** pertencentes aos seguintes subgêneros: **Stegomyia**, **Finlaya**, **Howardina**, **Ochlerotatus**, **Aedes**, **Aedimorphus** e **Soperia** (FORATTINI, 1965).

Entre as muitas espécies de **Aedes** já descritas, **Aedes aegypti** é a de mais ampla distribuição e a que tem sido mais estudada, sob muitos aspectos. **Aedes aegypti** foi descrita por Linneu em 1762 e pertence ao subgênero **Stegomyia**. É originária da África, mas está presente em todos os continentes. É considerado o mosquito mais doméstico existente, pois, dentro das casas, é comum encontrar todas as suas formas: ovo, larva, pupa e adultos, tanto machos como fêmeas (SUCAM, 1989).

De acordo com TABACHNICK et al. (1979), **Aedes aegypti** é uma espécie complexa na medida em que variações morfológicas, fisiológicas e comportamentais, encontradas nesta espécie, são maiores que as encontradas na maioria das espécies de insetos. Por exemplo, os autores descrevem uma situação evolutiva particularmente interessante, no distrito de Rabai próximo a Mombasa, Kenya. Nesse local ocorrem duas formas de **Aedes aegypti**. Uma forma é clara, encontra-se associada ao homem sendo, portanto, doméstica, e coloca seus ovos em potes costumeiramente mantidos com água dentro das cabanas das vilas. A outra forma, escura, silvestre, habita a floresta adjacente e coloca seus ovos em locais como buracos de

árvores. Os autores mencionaram que alguns pesquisadores reconhecem uma terceira forma, intermediária (peridoméstica), que coloca seus ovos em áreas modificadas, tais como plantações de coco.

MATTINGLY (1957) apud TABACHNICK & POWELL (1979) foi um dos primeiros a reconhecer formalmente esta natureza politépica de *A. aegypti* e designou a subespécie clara, doméstica, de *A. aegypti aegypti* e a subespécie escura, silvestre de *A. aegypti formosus*.

Considera-se mais provável que a forma ancestral de *A. aegypti* seja a silvestre. Das 34 espécies africanas do subgênero *Stegomyia*, somente *A. ae. aegypti* é encontrada fora da região etiópica, e é também a única que prefere colocar seus ovos em criadouros artificiais (PETERSON, 1977 apud TABACHNICK & POWELL, 1979).

A evolução das características que permitiram à espécie multiplicar-se em habitats feitos pelo homem foi crucial na difusão da espécie por toda parte no mundo tropical. Algumas das características comportamentais mais importantes que estão associadas com a domesticidade são: integração ao ambiente da casa, preferência por sítios de oviposição feitos pelo homem e preferência por alimentar-se de sangue humano (TABACHNICK & POWELL, 1979).

Peterson (1977 apud TABACHNICK & POWELL, 1979) propõe que *A. ae. aegypti*, a subespécie doméstica, tenha se originado no norte da África. Com a expansão do deserto do Saara, o norte da África foi tornando-se mais árido, favorecendo, assim, uma intensa seleção para características comportamentais adaptadas aos hábitos humanos. Eventualmente, o deserto do Saara tornou-se uma barreira de isolamento entre a forma doméstica, recentemente evoluída junto à costa norte da África, e a forma ancestral e silvestre, junto ao sul

do Saara.

Posteriormente, as atividades comerciais humanas introduziram o *A. ae. aegypti* nas regiões urbanas da costa da África e o levaram para o resto do mundo. A introdução dessa subespécie no Novo Mundo, foi provavelmente, o resultado do extenso comércio escravo entre aquela região e a África, durante os séculos 15 a 19 (TABACHNICK & POWELL, 1979).

TABACHNICK & POWELL (1979) não encontraram "efeito do fundador" nas populações do Novo Mundo. Essas populações não são significativamente menos heterozigotas e mostram uma distribuição de frequências alélicas muito similar à das populações domésticas da África. A falta do "efeito do fundador" no Novo Mundo é provavelmente devida ao extenso comércio que ocorreu durante os 350 anos passados e a capacidade do *A. ae. aegypti* de migrar a bordo de um navio.

Em 1930, *A. aegypti* já era encontrado na maioria das regiões tropicais e subtropicais habitadas do mundo e em algumas regiões temperadas, durante os meses mais quentes (SLOSEK, 1986).

Em geral, a distribuição do mosquito é controlada pela sua própria biologia, que é afetada pelos limites de sua capacidade para suportar climas extremos e seu comportamento intimamente associado com populações humanas. A distribuição está diretamente relacionada com a temperatura. Os adultos não sobrevivem à temperatura de 60°C por 24 horas e a 42°C por 5 minutos. As temperaturas limites para o estágio de larva são de -8 a 46°C e, para os ovos, de 20 a 46°C (SLOSEK, 1986).

Como a água é necessária para o desenvolvimento dos ovos e dos estágios larvais, a abundância de chuva e sua distribuição



sazonal têm efeito no tamanho das populações do mosquito (MOORE et al., 1978).

O mosquito *A. aegypti* ocorre mais frequentemente entre as latitudes 25°N e 25°S. Foi encontrado em todos os países do hemisfério ocidental, com exceção do Canadá (SLOSEK, 1986). A altitude e outras condições topográficas também exercem influência na distribuição (FORATTINI, 1965).

As observações em laboratório indicam que a postura de ovos de *A. aegypti* pode ser feita diretamente na água ou nas paredes dos criadouros, pouco acima da superfície líquida (FORATTINI, 1965). VANDEHEY et al. (1979) verificaram a frequência de oviposição em fêmeas de *A. aegypti* doméstico, silvestre e criado em laboratório. Fêmeas virgens e acasaladas colocavam seus ovos em um tanque com água limpa até seis dias após uma alimentação com sangue. Foram observadas diferenças significativas na frequência de oviposição das fêmeas virgens e acasaladas e no número de ovos. O cruzamento entre essas populações, em F₁, F₂ e retrocruzamentos indicam que a oviposição é de herança poligênica.

Quanto às características da água, tem-se como estabelecido que existe preferência de *A. aegypti* por meios pouco poluídos, pobres em sais e matéria orgânica. Contudo, desde que as condições gerais sejam viáveis, é duvidoso que exista acentuada seletividade em relação a este fator, exceção feita para forte salinidade ou outro elemento marcadamente desfavorável (CRISTOPHERS, 1960 apud FORATTINI, 1965).

BABU et al. (1983) encontraram ovos e estádios imaturos de *A. aegypti* em tanques sépticos que continham água altamente poluída na cidade de Pondicherry (Índia). Existe, nessa cidade, cerca de



10.000 tanques sépticos os quais são lacrados, exceto por uma abertura em um tubo de ventilação que permite a dispersão de gases. Os mosquitos entram para oviposição e escapam pela abertura dos tubos de ventilação. Segundo os autores, essa observação exemplifica a potencialidade desta espécie em se adaptar a diferentes habitats.

Os locais de postura são, quase de maneira exclusiva, depósitos líquidos artificiais, situados em recipientes localizados bem próximos às habitações humanas ou mesmo dentro das casas. Assim sendo, existe uma grande variedade de tipos de criadouros como por exemplo, vasos de flores, calhas entupidas, caixas d'água, latas, pneus, garrafas, bebedouros de animais etc. (SUCAM, 1989). Importante, sob o ponto de vista da disseminação da espécie, é a presença de criadouros em ambientes portuários e em navios (FORATTINI, 1965).

Como já foi mencionado, em algumas áreas rurais da costa do Kenya, a água doméstica é guardada em jarros de barro ou tambores de metal colocados dentro das casas. Os jarros são enchidos duas ou três vezes ao dia, promovendo a manutenção de estádios imaturos de *A. aegypti* doméstico. De tempos em tempos (poucos dias ou várias semanas) os jarros são totalmente esvaziados e novamente cheios. SUBRA & MOUCHET (1984) perceberam que a produção de *A. aegypti* em alguns jarros era baixa, enquanto outros mostravam uma grande produção, em poucos dias. Embora esta baixa produtividade possa ser explicada por um intervalo menor de troca de água (menos que uma semana), o que não permitiria que os estágios pupais fossem alcançados, ocorria baixa produtividade também em jarros onde a água não era trocada por várias semanas. Os autores concluíram que alimentos, especialmente sopa de milho, acidentalmente introduzida



dentro dos potes, na maioria das vezes por crianças, poderia ser o fator chave para a regulação do tamanho dessas populações.

A. aegypti tem sido encontrado em alguns criadouros naturais, tais como, buracos de árvores, rochas, buracos de caranguejos, bambus, folhas de árvores, entre outros. Formas imaturas também têm sido encontradas em depósitos no solo, tais como lagos, rios, alagadiços, poças d'água e poços não cimentados ou tijolados. Nos vilarejos de Gori e Singathope, localizados em uma pequena ilha, próximos à cidade de Cuddalore (Índia), os poços são a única fonte de água fresca. Dos 78 poços examinados por PANICKER et al. (1982), 16 (20,5%) possuíam ovos e larvas de *A. aegypti*. Como quase todas as casas possuem poços, nessas duas vilas, os habitantes não estocam água em jarros e potes. Os autores admitem que a ausência de tais recipientes pode ser uma das razões para esta adaptação do mosquito aos poços.

Em se tratando de formas imaturas de *A. aegypti* associadas ao ambiente humano, o predomínio dos criadouros artificiais é grande e tanto maior quanto mais intensa essa associação. Nestes casos, mesmos os criadouros naturais têm como característica o fato de nunca estarem a grande distância das casas e locais habitados. Por outro lado, os meios naturais de desenvolvimento larvário são importantes quando se consideram os componentes silvestres deste complexo. Na África, as populações do mosquito *A. ae. formosus*, encontradas em ambientes florestais e desabitados, possuem como criadouros os buracos de árvores, de rochas e o embricamento de folhas como as da bananeira, entre outros (FORATTINI, 1965).

Em condições ideais, após o período de incubação, variável ao redor de 4 dias, a eclosão poderá ocorrer a qualquer momento ou

ser protelada por tempo prolongado, caso existam condições desfavoráveis (VANDERLEY et al., 1987).

O contato com a água parece ser o estímulo principal para a saída da larva e, em condições normais, a grande maioria dos ovos maduros eclode decorridos alguns minutos ou no máximo horas, após a submersão nesse meio líquido. Contudo, outros fatores podem exercer influência estimulante, como por exemplo a presença de microorganismos, a composição do meio, a presença de substâncias químicas e a existência de oxigênio dissolvido (THOMAS, 1943).

As larvas vivem na água, são onívoras, alimentando-se principalmente de detritos orgânicos, bactérias, leveduras vivas e pólen, através da filtração da água. A duração da fase larval é variável com a temperatura, mas em condições adequadas o desenvolvimento se completa num período de 6 a 8 dias (VANDERLEY et al., 1987).

KHAWALED et al. (1988) descreveram um modo adicional de alimentação das larvas de *A. aegypti*, a ingestão de carcassas de sua própria espécie e espécies relacionadas. Este comportamento pode suportar o desenvolvimento até a fase adulta, em locais onde não existam outras fontes de alimentação, e pode ser fatal caso a carcassa seja de larva morta pelo *Baccillus thuringiensis* var. *israelensis*. A toxicidade dessas carcassas para a larva que as come, é resultado da reciclagem de esporos na larva morta.

Durante o ciclo larval, o inseto se prepara para tornar-se adulto. As patas, asas e partes do aparelho bucal do mosquito adulto vão se formando lentamente e, no último estágio larval, podem ser vistos sob o tegumento da larva. A transformação em adulto se completa no estágio de pupa. Neste estágio, boca e ânus são selados

e assim a pupa não se alimenta, nem elimina excretas sólidos ou líquidos (JONES, 1978). O adulto recém emergido passa suas primeiras 24 horas em repouso, pousado nas paredes ou superfícies verticais, sombreadas, ao redor do criadouro. Depois inicia um período de vôos curtos em busca do sexo oposto para cópula e de um hospedeiro para alimentar-se. Não há ordem para cópula e alimentação. Durante o repouso, ocorre um desenvolvimento folicular parcial, cujo término está sujeito à ingestão de sangue na maioria dos insetos (anautogenia) (REYES-VILLANUEVA, 1990).

Os machos alimentam-se preferencialmente de fluidos "doces", como o néctar das flores. As fêmeas podem se alimentar de açúcar também, mas são dotadas de acentuada hematofagia. Em média, a fêmea de *A. aegypti* ingere cerca de 2,8 miligramas de sangue (JONES, 1978). Segundo CRISTOPHERS (1960) apud MARINOTTI et al. (1990), a fêmea de *A. aegypti* precisa ingerir açúcar para a demanda energética do metabolismo basal e do vôo, e precisa ingerir sangue para o desenvolvimento dos ovos.

A forma doméstica e urbana de *A. aegypti* tem acentuada preferência pelo sangue humano e de alguns animais domésticos, ao passo que os representantes silvestres não sugam o homem ou o fazem de maneira esporádica (FORATTINI, 1965).

A atividade do *A. aegypti* é essencialmente diurna, sendo, portanto, considerado como o culicineo sugador das horas luminosas do dia. Contudo, existe a possibilidade de relação entre o máximo de ação hematófaga e a ovulação. Por consequência, enquanto fêmeas nulíparas sugariam preferencialmente de dia, as ovíparas o fariam à noite. Dessa forma, considera-se, também, a existência de atividade noturna desta espécie. Todavia, as verificações deste aspecto

particular do comportamento, nem sempre são concordantes (FORATTINI, 1965).

Segundo A. **aegypti** é considerado o clássico transmissor do vírus da febre amarela (arbovírus, da família **Togaviridae**, do gênero **Flavivirus**). Os vírus se alojam na glândula salivar, sendo a transmissão via oral. Transmitem também o vírus do dengue (arbovírus da família **Togaviridae**, do gênero **Flavivirus**), constituído por quatro sorotipos (1, 2, 3 e 4) e o vírus da encefalite Venezuelana (VANDERLEY et al., 1987).

SOEKIMAN et al. (1986) consideram o A. **aegypti** como importante vetor do vírus Chikungunya, pertencente ao grupo dos arbovírus, da família **Togaviridae**, gênero **Alphavirus** (este gênero inclui várias espécies causadoras de encefalite), que se encontra amplamente distribuído nas áreas tropicais da Ásia e na África.

A febre amarela possui duas formas bem características de transmissão: a primeira através da picada do mosquito A. **aegypti** em áreas urbanas e a segunda através de picadas de mosquitos de hábitos silvestres do gênero **Haemagogus** e **S. Cleroapterius** (LIMA, 1985).

Segundo FRANCO (1969), a primeira epidemia de febre amarela no Brasil ocorreu em 1685, na Cidade de Recife, Estado de Pernambuco.

De acordo com LIMA (1985), a forma urbana da doença foi erradicada no Brasil em 1942. Persiste, no entanto, a ocorrência da forma silvestre, uma vez que o vírus circula nas matas, predominantemente, entre os mosquitos e algumas espécies de macaco.

O Brasil possui a maior área endêmica da febre amarela do mundo. Abrange toda a Bacia Amazônica, incluindo as macroregiões Norte e Centro-Oeste. Os riscos de urbanização da febre amarela



decorrem da possibilidade de infecção do *A. aegypti* por pacientes portadores da doença, contraída naquelas regiões (TAUIL, 1986). Segundo esse autor, em 1955, após muitos anos de luta contra o *A. aegypti*, o Brasil logrou erradicá-lo do País. Da mesma forma, 18 países da América também o fizeram na mesma década (a erradicação continental do mosquito é considerada a única forma segura de prevenir epidemias de febre amarela urbana e de dengue). Porém, a partir dos países americanos que não erradicaram o mosquito, praticamente todos os 18 países foram reinfestados. Muitas vezes, essas reinfestações foram detectadas a tempo e eliminadas. Outras vezes, a vigilância entomológica não conseguiu esta detecção precoce, principalmente em virtude de uma pressão de entrada exageradamente alta do mosquito a partir de países muito infestados, gerando a situação atual, extremamente preocupante, em quase todos os países das Américas e em extensas áreas do território nacional.

As amostras de *A. aegypti* coletadas nas áreas recentemente recolonizadas também não mostraram diminuição na variação genética indicativa de efeito do fundador (TABACHNICK & POWELL, 1979).

Segundo SLOSEK (1986), a distribuição desses organismos continua instável porque, mesmo as áreas novamente declaradas livres do mosquito na década de 70 estão sujeitas à reinfestação devida à persistência das populações de *A. aegypti* em outros locais.

Epidemias de dengue são registradas anualmente no continente. No Brasil, ocorreu uma epidemia em 1982, no Território de Roraima, registrando-se cerca de 10000 casos em poucos meses, exigindo gastos extremamente elevados para o seu controle (OSANAI et al., 1983). Em março de 1986, registrou-se outra epidemia de dengue no Estado do Rio de Janeiro, em municípios da Baixada Fluminense

(TAUIL, 1987).

O período de viremia da febre amarela é relativamente curto (cerca de 3 dias após o início dos sintomas); o mesmo não acontece com o dengue, em que o mesmo período chega até a 7 dias. A possibilidade de um paciente portador da doença do dengue, contraída em outro país, chegar a uma cidade brasileira infestada por *A. aegypti* e disseminá-la é muito maior (TAUIL, 1986). Por outro lado, o dengue é de caráter geralmente benigno, porém, sua forma hemorrágica pode ser letal e foi registrada pela primeira vez nas Américas, em 1981 (GUZMAN, 1984 apud TAUIL, 1986).

A capacidade do mosquito *A. aegypti* em resistir à erradicação química tem se tornado um problema. O mosquito começou a mostrar resistência a organofosforados (incluindo DDT) no Caribe, em 1950 (SLOSEK, 1986). Malation, o pesticida normalmente utilizado para controlar populações adultas durante a maioria das epidemias de dengue, mostrou-se ineficiente para controlar adultos e larvas em San Juan, Porto Rico, durante a epidemia de 77-78 (FOX, 1980). Em 1980, a OMS (Organização Mundial da Saúde) divulgou a notícia da resistência desta espécie aos organofosforados: Malation, Fenitotrion, Fention e Temefos (Abate), usados amplamente no Caribe e países vizinhos e o Malation e Temefos, nos países asiáticos (REYES-VILLANUEVA, 1990). Esta capacidade do *A. aegypti* de se adaptar geneticamente aos inseticidas pode, eventualmente, frustrar completamente os esforços humanos para erradicá-lo (SLOSEK, 1986).

Os programas de vigilância operam determinando a densidade e distribuição das espécies de *Aedes*. Por exemplo, no Condado de Galveston, Texas, que é uma das áreas de risco de reintrodução do dengue, o programa controla *A. aegypti* desde 1977, em 17



comunidades. Larvas e adultos coletados em 6 dessas comunidades, comparadas com um padrão susceptível, mostraram tolerância 2 vezes maior ao Malation. O mesmo resultado foi obtido com larvas quanto a chlorpyrifos (MICKS & MOON, 1980).

No Estado de São Paulo, a SUCEN (Superintendência de Campanhas Endêmicas) realiza a vigilância baseada no índice de Breteau (n° de amostras positivas/ n° de residências visitadas $\times 100$). A cidade é dividida em setores e por sorteio algumas residências são visitadas pelo pessoal de controle que contam o número de recipientes com larvas. Quando este índice é menor que dois, inicia-se o controle "casa a casa" (pulverização das residências), quando este índice fica entre 2,1 e 4,9, além do controle "casa a casa" inicia-se também o "arrastão" (coleta de pneus, garrafas, latas e outros locais que possam juntar água) e a pulverização de inseticidas nos pontos estratégicos, com a máquina portátil. No entanto, se o índice for maior que 5 ou houver epidemia, inicia-se imediatamente a aplicação de inseticidas com o equipamento pesado, que faz a pulverização do produto nas ruas da cidade.

Atualmente, algumas investigações têm sido realizadas em busca de inseticidas de origem natural e que potencialmente possam ser incorporados no controle químico do vetor. A árvore da Índia, **Antelea azadirachta** (L.) é fonte de um grande número de triterpenóides policíclicos que regulam o crescimento em insetos. O composto mais investigado tem sido a azadirachtina, que altera fortemente o crescimento do adulto de **A. aegypti** quando aplicado em larvas de 4^o estágio, além de mostrar efeitos inseticidas sobre os mosquitos (ZEIBITZ, 1986 apud REYES-VILLANUEVA, 1990). Mais

recentemente foi descrito que extratos de frutos maduros de uma árvore africana, a **Melia volkensii** (Gurke), inibem o crescimento de larvas de **A. aegypti** além de produzir altos níveis de mortalidade. Especula-se que o composto ativo desta planta é mais potente que a azadirachtina (MWAUGI & REMBOLD, 1988 apud REYES-VILLANUEVA, 1990).

O biocontrole de mosquitos tem sido testado através de vários organismos, como por exemplo as bactérias **Bacillus thuringiensis** sorotipo H-14 e **B. sphaericus**. Esses microorganismos, no entanto são mais eficientes contra vetores que se criam em quantidades grandes de água, como pântanos, charcos e rios, não sendo recomendável, do ponto de vista prático, para o controle de vetores que se criam em depósitos temporários de água, como é o caso do **A. aegypti**. **Bacillus sphaericus** tem demonstrado ser muito efetivo contra o **Culex quiquefasciatus**, que é um vetor da filariose. Com base nisto, pode-se dizer que as espécies de **Bacillus** funcionam como biocidas e, neste sentido, se comparam com os inseticidas (REYES-VILLANUEVA, 1990).

Outros inimigos naturais de **A. aegypti** são todas as espécies de **Toxorhynchites**, as quais são predadoras na fase de larva; o adulto se alimenta de néctar e secreções vegetais. O maior atrativo de se empregar este mosquito predador como agente de biocontrole de **A. aegypti**, é a incrível capacidade das fêmeas em localizar os recipientes com larvas (elas o fazem muito mais rápido que o pessoal das campanhas antimosquito), além de se utilizar menos inseticidas (FOCKS, 1985 apud REYES-VILLANUEVA, 1990).

Em Nova Orleans, EUA, o controle de **A. aegypti** tem sido realizado mediante o uso combinado de controle biológico e químico. O primeiro, pela liberação semanal de 100 fêmeas grávidas de



Toxorhynchites amboinensis por quarteirão, e o segundo com a aplicação de Malation. Dos dois tipos de controle o mais efetivo é o primeiro. Experimentos têm demonstrado que a atividade do predador reduz a proporção do vetor em 70% e o controle químico em 26%. Somando, tem-se um total de 96% de redução de *A. aegypti* nesta área (FOCKS et al., 1986 apud REYES-VILLANUEVA, 1990).

Os copépodos da família Cyclopidae, atacam as larvas do mosquito, sendo também considerados inimigos naturais do *A. aegypti*. SUAREZ et al. (1984 apud REYES & VILLANUEVA, 1990) foram os primeiros a relatar a depredação de estádios imaturos deste mosquito em recipientes artificiais, na Colômbia, pelo copépoda *Mesocyclops aspericornis*.

NENG et al. (1987) relatam o controle de *A. aegypti* na região central e sul da China, com o uso do peixe *Clarias fuscus* (peixe-gato chinês), o qual é altamente larvívoro e tolera fortes mudanças ambientais.

Como foi dito, inicialmente, ocorrem também, nas Américas, outras espécies de *Aedes*, além do *A. aegypti*. Foi, por exemplo, um fator bastante preocupante para os epidemiologistas, especialmente pela sua relação com a encefalite, a detecção, pela primeira vez em território Sul-Americano, do mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), encontrado no Brasil, em 1986, no Estado do Rio de Janeiro (FORATTINI, 1986). Em 1989 outros quatro Estados brasileiros já se encontravam infestados: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio Grande do Norte e São Paulo (SUCAM, 1989). Hoje, a incidência dessa espécie está se tornando bastante preocupante, no Estado de São Paulo.

O *A. albopictus* é um mosquito primitivamente silvestre que se adaptou ao ambiente urbano. Pode ovipositar sem repasto sanguíneo



(autogenia), em criadouros naturais e artificiais. É originário da Ásia e possui uma distribuição geográfica ampla, atingindo zonas tropicais e temperadas (TAUILL, 1987).

As espécies **A. aegypti** e **albopictus** são ecologicamente homólogas e simpátricas podendo, pois, coexistirem na mesma região, utilizando os mesmos tipos de criadouros. Contudo, **A. albopictus** apresenta um grau maior de exofilia e de hábitos silvestres (FORATTINI, 1986).

Nos Estados Unidos, a primeira população de **A. albopictus** foi encontrada em 1985, no Texas (MONATH, 1986). Em 1986, o mosquito já era encontrado em vários estados americanos e em 1987, na maioria deles. A presença de **A. aegypti** em uma área não parece retardar o ingresso do **A. albopictus**. Na verdade, este substituiu o primeiro em muitos locais (MOORE et al., 1988).

HAWLEY et al. (1987) lançaram a hipótese de que o **A. albopictus** norte-americano teria se originado do norte e não da região tropical da Ásia. Os autores coletaram linhagens de várias regiões e verificaram que linhagens coletadas na China, Coreia e Japão, assim como do Texas, Louisiana, Flórida, Tennessee e Indiana são sensíveis ao fotoperíodo, enquanto linhagens da Ásia tropical como de Mauritius, Madagascar e Norte de Taiwan não são sensíveis. Em adição, as linhagens norte-americanas, assim como as japonesas, possuem uma grande resistência a temperaturas baixas, diferentemente das linhagens da Ásia tropical. Um outro fator que contribui para esta hipótese é o fato de que pneus usados são importados em grande número, pelos EUA, do Norte da Ásia e pneus usados são o sítio primário de oviposição do **A. albopictus** na América do Norte (HAWLEY et al., 1987).



Na Ásia, o **A. albopictus** é um conhecido vetor do dengue, também nas formas hemorrágicas e da síndrome de choque do dengue. Alguns estudos têm mostrado que ele pode ser um vetor eficiente e um reservatório do vírus La Crosse que é o mais patogênico arbovírus da família Bunyavirus, responsável pela encefalite Califórnia. Transmite ainda o vírus San Angelo que também está relacionado com a encefalite Califórnia (MONATH, 1986). É ainda um importante vetor do vírus Chikungunya, já mencionado (SOEKIMAN et al., 1986). Em laboratório, essa espécie já se mostrou susceptível a outros vírus, como o da encefalite St. Louis e Japonesa e o vírus do Nilo Oeste e de Kunjin, todos arbovírus, da família Togaviridae, do gênero **Flavivirus**. É também susceptível, em laboratório, ao vírus da febre amarela (TAUIL, 1987).

A encefalite La Crosse (LAC), uma das mais importantes doenças transmitidas por mosquitos nos Estados Unidos, é endêmica na região meio-oeste superior. O ciclo natural do vírus LAC está associado ao mosquito **Aedes triseriatus**. As larvas desse mosquito desenvolvem-se principalmente em pneus abandonados e buracos de árvores. Em 1979 foi introduzida nos EUA uma nova espécie, **Aedes (Ochlerotatus) atropalpus**, que demonstrou ser capaz de infectar-se oralmente, de transmitir, por meio transovarial, o vírus a adultos F_1 , e de transmiti-lo, por meio da picada, aos animais que forem sugados (FREIER & BEIER, 1984).

Devido à presença de **A. aegypti**, nas mesmas áreas, foi difícil determinar a contribuição do **A. albopictus** na transmissão de doenças. Entretanto, em várias epidemias, nas quais **A. aegypti** estava ausente, ficou estabelecida a função de vetor do **A. albopictus**, como por exemplo nas Ilhas Seychelle no Oceano Índico

(METSELAAR *et al.*, 1980).

Experimentos quantitativos realizados por ROSEN *et al.* (1983) determinaram que o *A. albopictus* é mais susceptível à infecção oral com os 4 sorotipos do dengue do que o *A. aegypti*.

A população de mosquito *A. albopictus*, no Brasil, é geneticamente distinta da linhagem norte-americana, segundo MILLER & BALLINGER (1988). Esses autores trabalharam com mosquitos coletados na Cidade de Cariacica, no Estado do Espírito Santo, e notaram que embora essa população seja facilmente infectada pelos 4 sorotipos do vírus da dengue e seja capaz de transmitir, ela é significativamente menos susceptível à infecção e, transmite a infecção em menor proporção, quando comparada com populações norte-americanas. Entretanto, os autores ressaltam que foi examinada apenas uma linhagem, e que outras linhagens com potencial de vetor diferente podem existir no Brasil.

Ainda segundo MILLER & BALLINGER (1988), não é necessário um vetor eficiente para ocorrer uma epidemia. Aconteceu recentemente na Nigéria uma epidemia de febre amarela urbana, transmitida por uma linhagem de *A. aegypti* extremamente ineficiente como vetor. Um grande número de mosquitos aumenta o contato mosquito-homem, aumentando significativamente a chance de um mosquito infectado transmitir a doença.

As dificuldades para erradicar ou controlar o *A. albopictus* são muito grandes, principalmente por seus hábitos urbanos e rurais. Há ainda o risco desta espécie servir como "ponte" entre as formas silvestre e urbana da febre amarela (TAUIL, 1987).

Embora várias hipóteses tenham sido levantadas (TABACHNICK *et al.*,

Algumas linhagens de **A. albopictus** também são resistentes a inseticidas organofosforados, como demonstrou WESSON (1990) através de experimentos com 26 linhagens de regiões diferentes (13 dos EUA, 5 do Brasil, 3 da Ásia e 5 do Japão).

Como já foi mencionado, além da transmissão oral, os vírus podem ser mantidos em populações de **Aedes** através da transmissão transovarial (vertical ou transgeracional) durante períodos interepidêmicos. ROSEN et al. (1983) demonstraram, por experimentos em laboratório, que ocorre a transmissão transovarial em **A. albopictus** para os 4 sorotipos do vírus do dengue. Em 1988, ROSEN demonstrou também este tipo de transmissão nesta espécie para 2 linhagens do vírus da encefalite St. Louis.

HULL et al. (1984) coletaram ovos e larvas de **A. aegypti** em 10 locais diferentes de Trinidad. Esses locais foram escolhidos porque neles já haviam ocorrido casos de dengue anteriormente. Dos insetos adultos nascidos no laboratório, os autores conseguiram isolar o vírus do dengue tipo 4, mostrando assim, que a transmissão transovarial ocorre na natureza.

Existem muitos fatores que envolvem o vírus, o vetor e o hospedeiro vertebrado, determinando a prevalência da febre amarela em uma determinada área. Desde que foi levantada, por DUDLEY (1934 em TABACHNICK et al., 1985), a hipótese de que a ausência de febre amarela na Ásia seja devida à ineficiência do mosquito **A. aegypti** asiático como vetor do vírus da febre amarela, várias pesquisas têm tentado relacionar variações geográficas com a competência do inseto como vetor. O mecanismo e as bases genéticas desta variação geográfica na susceptibilidade do vetor permanecem desconhecidas, embora várias hipóteses tenham sido levantadas (TABACHNICK et al.,

1985). Outros trabalhos têm contribuído para o conhecimento de *A. aegypti*. Usando técnicas de eletroforese, muitos pesquisadores realizaram estudos de isoenzimas em *A. aegypti*, mostrando que a espécie pode ser dividida em vários grupos com base em diferenças genético-geográficas. A existência desses grupos pode ter um grande significado epidemiológico. Tais estudos têm mostrado que *A. aegypti* é representado por pelo menos 8 grupos genético-geográficos. Esses grupos são: *A. ae. aegypti* do Leste da África, *A. ae. formosus* do Leste da África, *A. ae. formosus* do Oeste da África, e *A. ae. aegypti* da Ásia, do Sudeste dos USA, do Sudoeste USA-México, da América Central-Sul (com Trinidad) e do Caribe (WALLIS et al., 1983).

TABACHNICK et al. (1985) analisaram 28 populações de *A. aegypti* de várias regiões do mundo e testaram a sua facilidade de se infectar com o vírus da febre amarela. As populações foram analisadas para a variação genética de 11 loci de isoenzimas e relacionadas com um dos 8 grupos de *Aedes* acima descritos. Os resultados mostraram que populações com o mesmo padrão de isoenzimas apresentaram similaridade para se infectar oralmente. As populações domésticas do Caribe, da América Central-Sul e Leste da África são significativamente mais susceptíveis à infecção oral do que as populações silvestres do Oeste da África. Esses resultados dão suporte à hipótese de que existe variação genética para a susceptibilidade oral do *A. aegypti* ao vírus da febre amarela.

ROSEN et al. (1983) também demonstraram variações, na competência como vetor, entre diferentes linhagens geográficas de *A. albopictus*.

Muitos outros trabalhos têm contribuído para o conhecimento da variação genética em *Aedes* com o uso de técnicas de eletroforese para analisar variações nas proteínas. Por exemplo, TABACHNICK & POWELL (1979) analisaram populações de *A. aegypti* de várias regiões do mundo, mostrando uma correlação entre variação eletroforética e populações com comportamento, morfologia e ecologia similares, independente da proximidade geográfica. POWELL & TABACHNICK (1980) analisaram 34 populações de ampla distribuição do mosquito *A. aegypti* quanto à variação de 19 a 22 enzimas, cujos resultados tornaram possível determinar a origem regional de cada população. TABACHNICK (1982) analisou populações de *A. aegypti* em diferentes áreas de Nova Orleans, num período de 4 anos, quanto à variação genética de 12 loci de isoenzimas. A maioria dos loci não apresentou polimorfismo genético nas diferentes áreas, nem com o passar do tempo. HARRINGTON et al. (1984) analisaram a variação genética em 16 locais urbanos de *A. aegypti* na Cidade de Houston. Foram examinados 10 loci de enzimas, dos quais 4 foram identificados como polimórficos e os restantes, monomórficos. Segundo os autores, os resultados sugerem que as populações de *A. aegypti*, em Houston, não são geneticamente subdivididas.

WALLIS et al. (1984) analisaram a variação genética de 11 loci de 18 amostras de *A. aegypti* do Caribe. Os resultados mostraram que, enquanto existe alguma relação entre proximidade geográfica e distância genética, é comum uma grande semelhança entre as ilhas quanto à frequência gênica desses mosquitos, com algumas amostras não distribuídas de acordo com qualquer padrão geográfico.

Espécies de *Aedes* cruzam-se em laboratório e essa hibridização experimental, que tem tido por objetivo verificar as

relações genéticas entre as espécies, tem sido realizada por vários pesquisadores, consistindo em uma parte relativamente grande da bibliografia existente sobre o gênero. Sabe-se que os mecanismos que isolam reprodutivamente uma espécie da outra são os mais importantes atributos de uma espécie, desde que eles, por definição, constituem um critério de espécie (DOBZHANSKY, 1973).

HICKEY (1961 apud HARTBERG & CRAIG, 1968) realizou cruzamentos entre várias linhagens de *A. aegypti* de diversas origens geográficas, com o objetivo de testar a existência de barreiras reprodutivas entre as linhagens. Estas mostraram fortes diferenças no potencial reprodutivo. Entretanto, todas as linhagens hibridizaram facilmente e nenhuma barreira reprodutiva entre elas foi notada.

Os experimentos de HARTBERG & CRAIG (1968) indicaram que machos de *A. ae. aegypti* e *A. ae. formosus* reconhecem facilmente suas próprias fêmeas e as separam de fêmeas de *A. (Stegomyia) mascarensis*. O macho de *A. aegypti* escolheu a fêmea de sua própria espécie, mesmo em situações em que as fêmeas de *A. mascarensis* estavam em maior número. Quando nenhuma opção era dada, no entanto, o macho de *A. aegypti* cruzava facilmente com as fêmeas de *A. mascarensis*. Uma situação interessante ocorre entre *A. ae. aegypti* e *A. ae. formosus*. Quando dada a escolha para o macho de *A. ae. aegypti* entre fêmea *A. ae. aegypti* e a fêmea *A. ae. formosus*, o macho escolhe a fêmea *A. ae. aegypti*. Entretanto, o macho *A. ae. formosus* também escolhe a fêmea *A. ae. aegypti*. Os autores sugerem que esta preferência pode ser devida aos experimentos serem realizados em laboratório. A atividade da fêmea silvestre *A. ae. formosus* é modificada quando esta é confinada em gaiola. Assim,

talvez a fêmea urbana (doméstica) seja mais adaptável à gaiola, não sendo, portanto, tão afetada e mostrando-se mais atrativa aos machos. O macho *A. ae. aegypti* demonstra preferência pela fêmea *A. ae. formosus* em relação à fêmea *A. mascarensis*.

Segundo HARTBERG & CRAIG (1970), são escassas as evidências da degeneração do híbrido em mosquitos *aedine*, considerando que, são relativamente abundantes, as evidências da presença de outros mecanismos de isolamento pós-zigóticos. A razão para isto é atribuída ao fato de que a maioria dos estudos de isolamento reprodutivo têm se restringido à geração F_1 . Baseados nisso, esses autores realizaram estudos de isolamento pós-zigóticos com *A. aegypti* e *A. mascarensis* e notaram que certos cruzamentos produziam machos anormais em F_2 e gerações retrocruzadas. Quando machos F_1 resultantes do cruzamento de fêmeas *A. aegypti* X machos *A. mascarensis* foram retrocruzados com fêmeas *A. aegypti*, alguns machos da progênie eram intersexuados. Uma proporção maior de machos anormais foi observada no retrocruzamento sucessivo com fêmea *A. aegypti*. Quando a proporção de material genético de *A. aegypti* era maior que 50%, maior era o número de indivíduos anormais produzidos; quando era igual ou menor que 50% nenhuma anormalidade era encontrada.

Segundo os autores, esses dados indicam que as anormalidades produzidas em certos cruzamentos entre *A. aegypti* e *A. mascarensis* não são devidas a um único gene ou à incompatibilidade citoplasmática e sugerem mecanismos hipotéticos que podem ser responsáveis por essa degeneração do híbrido, baseados na presença de genes múltiplos.



Muitos outros experimentos de hibridização em *Aedes* foram realizados, como por exemplo, entre espécies do grupo *Aedes* (*Stegomyia*) *scutellaris* realizados por DEV & RAI (1984), SHERRON & RAI (1984a,b) e DEV & RAI (1985), os quais mostram que várias dessas espécies se cruzam e produzem descendentes férteis. Entretanto, foi observada também a produção de intersexos em F_1 , F_2 e na progênie de retrocruzamento entre outras espécies.

Outros estudos de hibridização foram realizados em *Aedes* (*Protomacleaya*) *triseriatus* com *A.* (*Protomacleaya*) *brelandi* e *A.* (*Protomacleaya*) *hendersoni*. A maioria dos machos da progênie era intersexuada e estéril quando machos *A. brelandi* ou *A. hendersoni* eram cruzados com fêmea *A. triseriatus*. Fêmeas híbridas e machos de cruzamentos recíprocos eram morfologicamente normais e férteis (TAYLOR, 1987).

Além de *A. aegypti* e *A. albopictus*, várias outras espécies de *Aedes* foram encontradas no Brasil mas, em geral, não há dados sobre sua atuação como vetores de doenças. Entre elas inclui-se o *A.* (*Finlaya*) *fluviatilis*. Esta espécie foi descrita por Lutz (1904) e se distribui amplamente nas Américas Central e do Sul. Contudo, parece ser predominantemente sul-americana. As fêmeas são hematófagas bastante ativas, atacando o homem e animais e ovipõem em criadouros naturais e artificiais, possuindo, portanto, uma certa tendência a se aproximar e, talvez, adaptar-se ao meio humano (FORATTINI, 1965).

Segundo SOPER et al. (1933), existe a possibilidade desta espécie veicular o vírus da febre amarela em ambiente natural. Esta possibilidade foi sugerida por observações epidemiológicas no Estado do Espírito Santo. CAMARGO et al. (1983) descreveram que este

mosquito pode ser infectado com o vírus *Plasmodium gallinaceum*.

LUSTOSA et al. (1989) relataram a ocorrência de *A. fluviatilis* pela primeira vez em Goiânia, Estado de Goiás, a partir de coletas de larvas e pupas em tambores com água, utilizados na construção civil. Coletaram também insetos adultos, com hábitos antropofílicos, o que provavelmente, segundo os autores, pode ser um problema adicional nas ações de controle da febre amarela.

Hoje, portanto, no Brasil, o alerta com relação a *Aedes* refere-se a 3 espécies: *A. aegypti*, *A. albopictus* e *A. fluviatilis*, o último em decorrência de seu potencial como vetor.

O estudo biológico, dessas espécies, pode ser importante pela possibilidade de contribuir para o conhecimento de novas formas de abordagem visando ao seu controle. Foi este o objetivo do presente trabalho.

Em levantamento bibliográfico realizado inicialmente, foi obtido um número muito pequeno de referências a estudos citológicos e citogenéticos do gênero *Aedes*, fato reforçado pelo trabalho de MARCHI & RAI (1986), segundo o qual "informações citológicas sobre o gênero *Aedes* são muito limitadas".

Assim, no presente trabalho, foi realizado um estudo citogenético de duas espécies que ocorrem na região de São José do Rio Preto: *A. aegypti* e *A. fluviatilis*. Foram analisadas células em mitose e meiose de larvas e pupas das duas espécies visando obter informações sobre seus cromossomos, sobre os mecanismos de divisão mencionados e sobre a síntese nucleolar.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Espécies Utilizadas

Foram utilizadas, neste trabalho, duas espécies de **Aedes**: **Aedes aegypti** e **Aedes fluviatilis**. O gênero **Aedes** pertence à família Culicidae e sub-família Culicinae.

2. Origem das Amostras Analisadas

As amostras de **A. aegypti** analisadas foram obtidas em São José do Rio Preto e Marília, SP. As de São José do Rio Preto foram coletadas em diversos pontos da cidade, em borracharias e outros locais com depósitos de águas paradas. Em sua maioria, essas coletas foram realizadas por funcionários da Superintendência de Campanhas Endêmicas (SUCEN), da cidade.

As amostras de **A. aegypti** de Marília foram obtidas no laboratório local da SUCEN, onde é feita a criação desses mosquitos.

Quanto às amostras de **A. fluviatilis**, estas foram obtidas no laboratório da SUCEN de Araraquara, que também mantém criadouros desta espécie.

Foram, portanto, analisadas amostras de **A. aegypti** criadas no ambiente da cidade e amostras das duas espécies criadas em laboratório.



3. Manutenção das Amostras no Laboratório

O material biológico, composto de larvas e pupas, foi transferido para o laboratório com a água do local de coleta e assim mantido durante o tempo de preparo das lâminas (aproximadamente uma semana).

Quando a amostra era muito grande, para evitar perdas de indivíduos na fase adequada do desenvolvimento, parte dos exemplares eram preservados para uso futuro, em uma solução fixadora descrita por Pienaar (1955 em MUKHERJEE & REES, 1970). Esta solução é composta por:

- 6 partes de metanol,
- 3 partes de clorofórmio e
- 2 partes de ácido propiônico.

Acrescenta-se água, na proporção de 1 parte de água e 2 partes da solução de Pienaar.

4. Preparações Citológicas

Os órgãos utilizados para preparações citológicas foram gânglios cerebrais de larvas de 4^o estágio e testículos de pupa. De *A. aegypti* de Marília, além dos órgãos mencionados, foram também analisados gônadas e túbulos de Malpighi de larvas de 4^o estágio.

Nas preparações citológicas foi empregada a técnica de esmagamento seguida de coloração com orceína lacto-acética ou nitrato de prata.

Foram coradas com orceína lacto-acética as lâminas de gânglios cerebrais e testículos de ambas as espécies e de gônadas



larvais de *A. aegypti* procedente de Marília. A coloração com nitrato de prata foi realizada em lâminas de gânglios cerebrais e túbulos de Malpighi de larva de 4^o estágio e em lâminas de testículo de pupa de *A. aegypti* de Marília.

4.2. Coloração com nitrato de prata

4.1. Esmagamento e coloração com orceína lacto-

acética. As lâminas dos tecidos, para coloração com nitrato de prata, foi basicamente a mesma da técnica anteriormente descrita. As larvas ou pupas eram removidas do recipiente com ajuda de um pincel, colocadas sobre uma placa de vidro, sob uma lupa (aumento de 400X), e, com a ajuda de dois estiletes, dissecadas em solução fisiológica de DEMEREC (DEMEREC & KAUFMANN, 1945).

Os órgãos eram transferidos, então, para uma gota de ácido acético (solução aquosa a 45%) em uma lâmina histológica onde permaneciam durante 30 segundos e transferidos para uma gota de orceína lacto-acética (2%) onde permaneciam por mais um minuto. A seguir, eram colocados em uma gota de ácido láctico (solução aquosa a 50%) durante cinco minutos, cobertos com lamínula e submetidos a esmagamento. As lâminas eram, em seguida, lutadas com esmalte incolor. A técnica de coloração utilizada foi a adaptação híbrida

das técnicas. As lâminas e lamínulas empregadas nas preparações foram previamente submetidas ao seguinte tratamento: colocadas em EXTRAN-MA-02 neutro (MERCK) a 2%, por 30 minutos, esfregadas individualmente, colocadas em uma cuba com água corrente, por uma hora e transferidas para solução sulfocrômica, por pelo menos 30 minutos. A seguir, as lâminas eram retiradas da solução sulfocrômica uma a uma, enxaguadas em água corrente e colocadas em uma cuba com água corrente por 20 minutos. Lâminas e lamínulas eram, então,

colocadas em um banho de água destilada por uma hora, e, em seguida, transferidas para solução alcoólica a 70%, no mínimo por 30 minutos e guardadas na geladeira, até o momento do experimento.

4.2. Coloração com nitrato de prata

A preparação das lâminas dos tecidos, para coloração com nitrato de prata, foi basicamente a mesma da técnica anteriormente descrita, exceto pela eliminação da orceína. As larvas eram dissecadas em solução fisiológica de DEMEREC (DEMEREC & KAUFMANN, 1945), o material transferido para ácido acético (solução aquosa a 45%), permanecendo neste por 30 segundos, e imediatamente transferido para ácido láctico (solução aquosa a 50%) durante cinco minutos. O material era, então, coberto por uma laminula e submetido imediatamente à esmagamento, conforme descrito no item anterior. Após o esmagamento, a laminula era retirada com o auxílio de nitrogênio líquido e as lâminas secas ao ar.

As lâminas, assim preparadas, eram submetidas à coloração com nitrato de prata.

A técnica de coloração utilizada foi a adaptação híbrida das técnicas de HOWELL & BLACK (1980) e BOQUIST (1990), descrita por BICUDO *et al.* (encaminhado para publicação). Nessa adaptação são utilizadas as duas soluções da técnica de HOWELL & BLACK. A primeira (solução A), é a solução coloidal reveladora, que se prepara dissolvendo 1 g de gelatina em 50 ml de água desionizada e acrescentando-se 0,5 ml de ácido fórmico. A solução B, solução de nitrato de prata, prepara-se dissolvendo 1 g de nitrato de prata em 2 ml de água desionizada.

O procedimento de coloração consiste em pingar uma gota da solução A e duas gotas da solução B sobre o material, na lâmina, misturar delicadamente, e colocá-la em uma caixa bem fechada, à temperatura ambiente, por 35 a 40 minutos, após o que a mistura das soluções torna-se marron-dourada. Lava-se muito bem com água desionizada e seca-se ao ar. As montagens foram feitas, colocando uma gota de verniz cristal sobre o material e, sobre ela, a lamínula.

5. Fotomicrografias

As fotomicrografias foram feitas em um Fotomicroscópio II Zeiss (doação FAPESP - Processo Biológicas nº 70/562). Os filmes utilizados foram o Kodak Panatomic X, 32 ASA; o AGFA COPEX PAN, 12 ASA e o Ilford PANF, 50 ASA. O papel fotográfico empregado foi o Kodabrome Print RC F-3.

Em todas as figuras, a escala corresponde a 10 micrômetros. A presença de escala em uma só foto componente da montagem significa que a escala é a mesma para as demais fotos componentes.

6. Análise Estatística dos Dados

Na análise dos resultados foi utilizada a análise da variância para homogeneidade das médias.



III. RESULTADOS

No presente trabalho, foram analisadas amostras de *A. aegypti* procedentes de São José do Rio Preto, coletadas em locais da cidade, e uma amostra procedente de Marília, obtida do criadouro da SUCEN daquela localidade. As amostras de *A. fluviatilis* foram obtidas do criadouro da SUCEN, em Araraquara.

Foram analisados cromossomos de gânglios cerebrais da larva e testículo da pupa, nas duas espécies, e de gônadas e túbulos de Malpighi da larva em *A. aegypti* de Marília. As lâminas foram coradas com orceína lacto-acética ou nitrato de prata. As observações realizadas serão descritas por coloração, espécie e órgão. Os números de indivíduos analisados, considerando ambas as técnicas, foram, para *A. aegypti* de São José do Rio Preto, 119, de Marília, 148 e de *A. fluviatilis*, 90.

1. Coloração com Orceína Lacto-Acética

1.1. *Aedes aegypti*

A. Gânglios Cerebrais

Como se observa nas figuras 1 e 2, os cromossomos das células em divisão, neste tecido, mostram, basicamente:

- 1 - O cariótipo formado por 3 pares de cromossomos, com pequena diferença de tamanho;
- 2 - O pareamento somático que ocorre entre os homólogos, neste processo de divisão mitótica, às vezes com íntima ligação entre os centrômeros e;

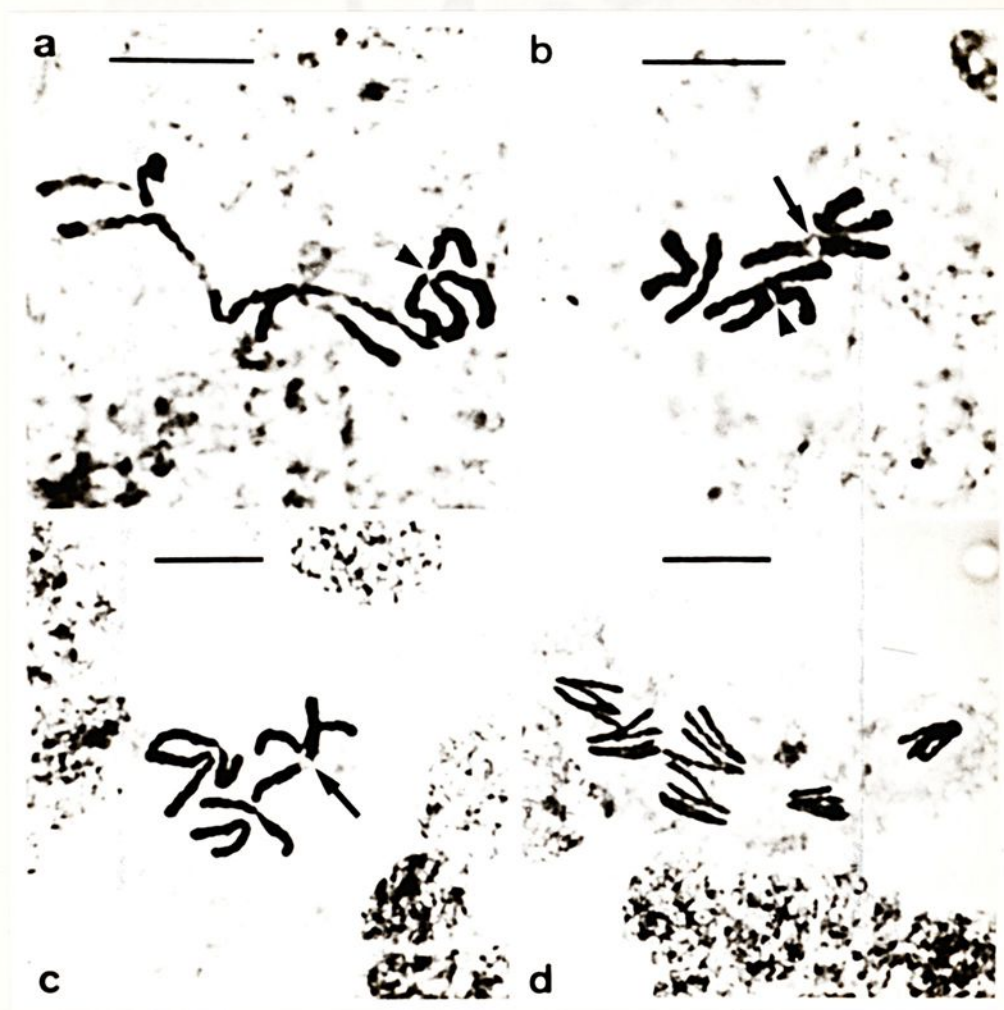


Figura 1. (a-d) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. Mitose em gânglios cerebrais. a. prometáfase; b,c. metáfases. Observe-se o pareamento somático, em a-c e a região centromérica bem visível em cromossomos de b e c (setas). Em a e b alguns centrômeros homólogos aparecem intimamente associados (cabeça de seta). d. anáfases irregulares quanto ao número e posição dos cromossomos.

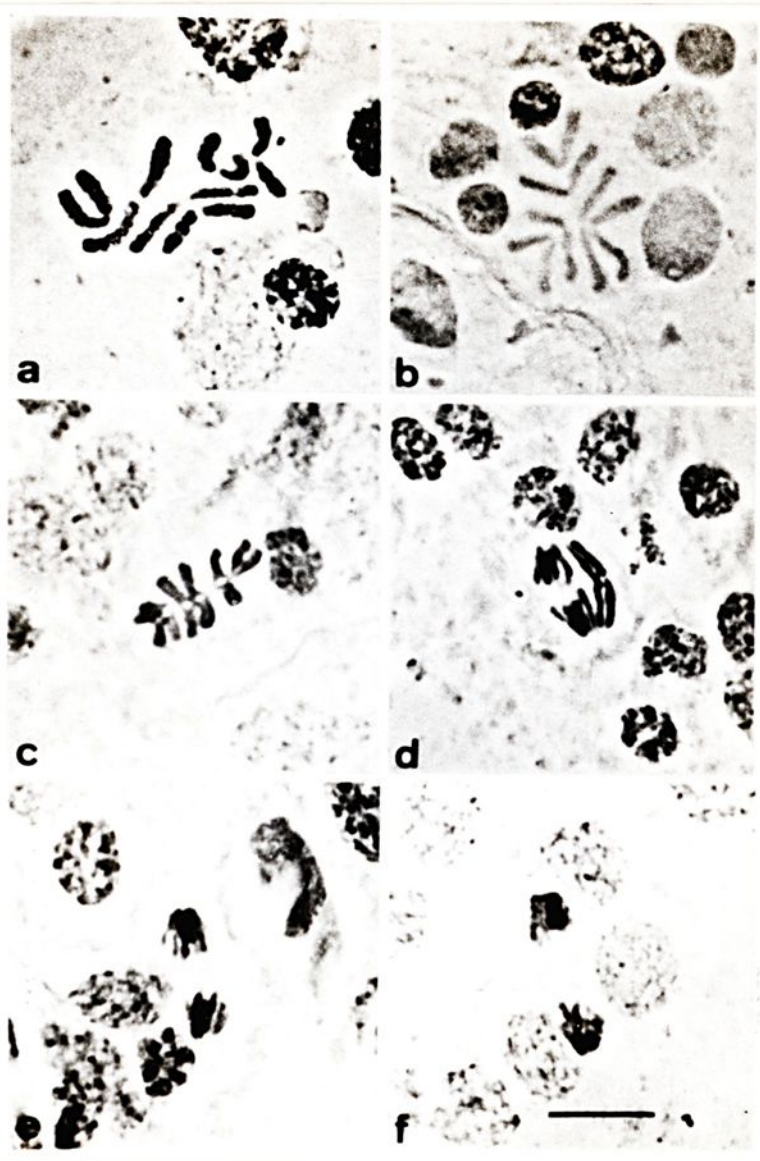


Figura 2. (a-f) - *Aedes aegypti* de Marília. Mitose em gânglios cerebrais. a-c. metáfases mostrando pareamento somático. A região centromérica é bem visível nos cromossomos de a. e c; d. anáfase mostrando separação assincrônica dos cromossomos; e-f. final de anáfase.

3 - A separação assincrônica dos cromossomos irmãos na anáfase, precoce no par mais curto e tardia no par maior.

Além desses aspectos normais, em *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto foram observadas anáfases irregulares quanto ao número e posicionamento dos cromossomos na migração (Fig. 1d).

B. Testículo de pupa e gônada de larva

Nos testículos foram observadas divisões mitóticas (que ocorrem nas espermatoogônias) e meióticas (que ocorrem nos espermatócitos).

Nas divisões mitóticas de testículo de *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto foi observado o pareamento somático já descrito para o cérebro (Fig. 3a). Foram também observadas anáfases irregulares quanto à migração e ao número de cromossomos (Fig. 3c, d). Em 3d observa-se uma célula poliplóide.

Em *Aedes aegypti* de Marília foram analisadas as gônadas de larvas, sem uma indicação segura se se trata de ovário ou testículo, pois, enquanto no testículo da pupa são observados espermatozóides em diferentes fases de formação, na larva isto não ocorre. Neste tecido também foram analisadas mitoses e meioses.

Os cromossomos em mitose nas gônadas larvais apresentaram as mesmas características já descritas na mitose cerebral, quanto ao pareamento somático (Fig. 4a-d), às vezes com ligação centromérica dos cromossomos (Fig. 4b e 4d). Uma constrição secundária, indicativa de região organizadora nucleolar foi observada em algumas células, no par de cromossomos menor (Fig. 4d). Em várias células, também foi observada uma ligação entre as cromátides irmãs, ao longo

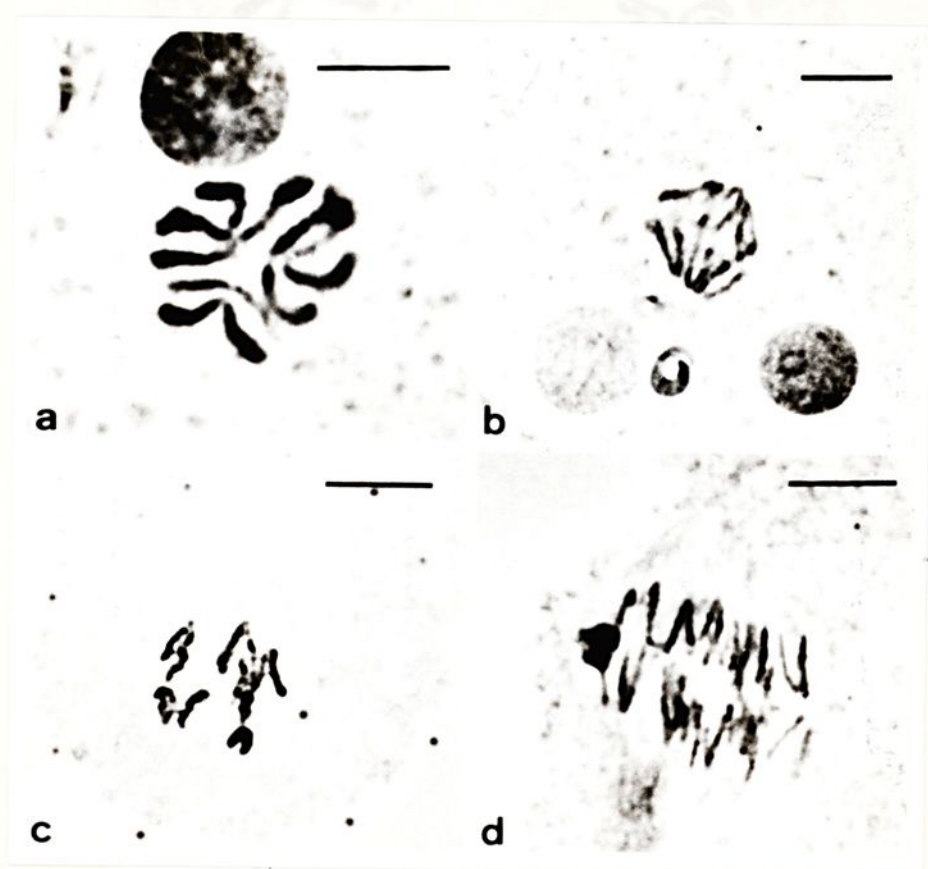


Figura 3. (a-f) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. Mitose em testículo. a. cromossomos metafásicos com pareamento somático. b. anáfase aparentemente normal. c,d. anáfases irregulares quanto à migração e ao número de cromossomos. Em d, há indicação de poliploidia.

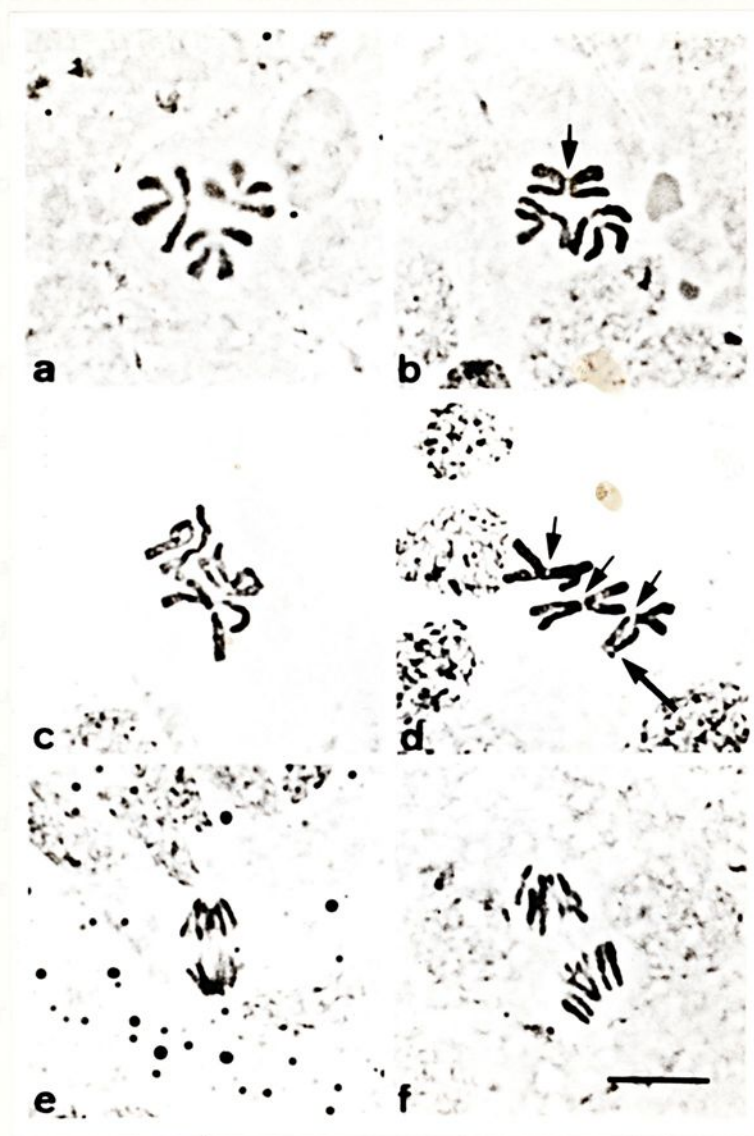


Figura 4. (a-f) - *Aedes aegypti* de Marília. Mitose em gônada larval. a-d. metáfases mostrando pareamento somático. Setas curtas em b e d indicam união entre homólogos na região centromérica. Seta longa em d aponta a constrição secundária. Em b-d observa-se, ainda, união entre cromátides irmãs, dando aspecto de bandas nos cromossomos. e-f. anáfases.

dos braços, dando aspecto de bandamento no cromossomo (Fig. 4b-d). Esta característica já havia sido observada, de forma menos evidente, nas mitoses de cérebro (Figs. 1b e 2a). As anáfases observadas neste tecido não mostraram anomalias (Fig. 4e,f).

Nas células do testículo foram observadas todas as fases da divisão meiótica. Na figura 5, que se refere a *A. aegypti* de São José do Rio Preto, são observadas fases de leptóteno a telófase da primeira divisão. Nesta figura são observados os quiasmas (Fig. 5e, f), a presença de extremidades heteromórficas, aparentemente devidas a deficiência (Fig. 5e), extremidades dos cromossomos homólogos ligadas (Fig. 5e,f), figuras de terminalização dos quiasmas (Fig. 5g) e a separação assincrônica dos cromossomos homólogos na anáfase (Fig. 5h). Nessa última figura os cromossomos do centro e da direita, embora de tamanhos diferentes, ainda permanecem ligados. Entretanto, há uma região menos intensamente corada, contendo filamentos, na região de ligação entre os dois braços do cromossomo menor e em um dos braços do cromossomo maior, sugerindo que o processo de separação, neles, se encontra mais adiantado. Os elementos do par de cromossomos da esquerda, nessa mesma figura 5h, ainda se encontram presos por um filamento ligando seus braços maiores.

Além do heteromorfismo de extremidades, mostrado na figura 5, frequentemente foram observadas interrupções na continuidade de um dos cromossomos pareados, em paquíteno ou diacinese, indicando tratar-se de quebras ou falhas cromossômicas, assim classificadas de acordo com sua extensão (mais amplas nas primeiras que nas segundas). Em todos os casos, a interrupção apresentava-se em heterozigose (Fig. 6).



Figura 5. (a-i) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto, 12.ª divisão da meiose em testículo. a. leptóteno; b. zigóteno; c, d. paquíteno; e. diplóteno; f. diacinese. A seta curta em e aponta extremidade heteromórfica dos homólogos aparentemente devida a deficiência. g. metáfase. As setas longas em e e f apontam região de contacto entre as extremidades dos homólogos nos pares de cromossomos. h. anáfase com separação assincrônica dos cromossomos homólogos; i. telófase.

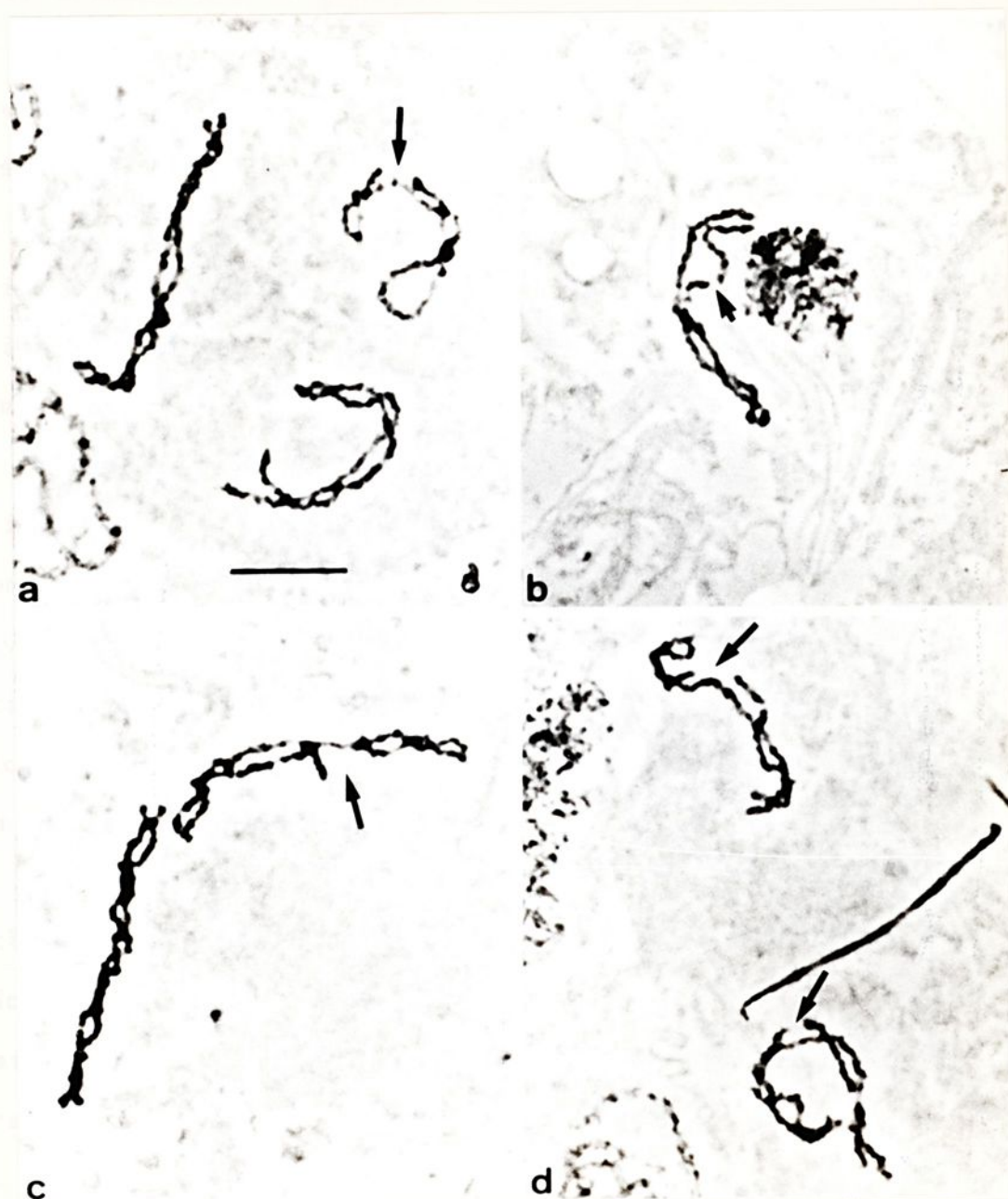


Figura 6. (a-d) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. 1ª divisão da meiose em testículo. Cromossomos em final de paquíteno ou diplóteno, mostrando interrupções na continuidade de um dos cromossomos. Setas longas em a, c, e d sugerem quebras cromossômicas (interrupções maiores) e a seta curta em b, uma falha cromossômica (interrupção menor).

Na figura 7 são observados alguns aspectos da terminalização dos quiasmas e a ligação entre cromátides homólogas que dá aos cromossomos um aspecto de presença de bandas (Fig. 7a-c). A figura 7d mostra uma anáfase, ainda da primeira divisão, em que há uma alteração da orientação anfitélica em um dos pólos. As figuras 7e,f mostram células em metáfase da segunda divisão meiótica, com presença de descontinuidade cromossômica em heterozigose, talvez uma falha (Fig. 7e), e um caso de heteromorfismo terminal, possivelmente devido à deficiência em uma das cromátides (Fig. 7f). Os braços cromossômicos estão bem separados.

Nos testículos de *A. aegypti* de São José do Rio Preto foram ainda encontradas outras anomalias. Pontes cromossômicas e cromossomos retardatários foram frequentes (Fig. 8a-f). Os últimos, muitas vezes não pareciam corresponder aos cromossomos do cariótipo da espécie devido ao seu tamanho menor, sugerindo antes tratar-se de fragmentos cromossômicos. Em 8f, os fragmentos retardatários aparecem constituindo micronúcleos.

Cromossomos retardatários maiores, mais numerosos e com disposição mais complexa são mostrados na figura 9. Às vezes há indicação, também, da possibilidade de pontes cromossômicas quebradas e mesmo distribuições anafásicas multipolares, como se vê na figura 9c,d.

Células poliplóides também foram observadas neste material (Fig. 10).

Um dos indivíduos apresentou um grande número de células, em metáfase, portadoras de aberrações cromossômicas caracterizadas principalmente por numerosas quebras, cromossomos alongados, como que esticados, com regiões de constrição e de alargamento e



Figura 7. (a-f) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. Testículo. Fases da 1ª e 2ª divisões da meiose. a-d. terminalização dos quiasmas e separação dos cromossomos na anáfase. Observe-se em a-c as "bandas" decorrentes de ligações entre as cromátides irmãs e em d, a orientação aparentemente não anfitélica dos cromossomos em um dos pólos. e-f. metáfase da 2ª divisão. A seta em e indica uma interrupção cromatídica e em f, uma deficiência terminal, ambas em heterozigose.

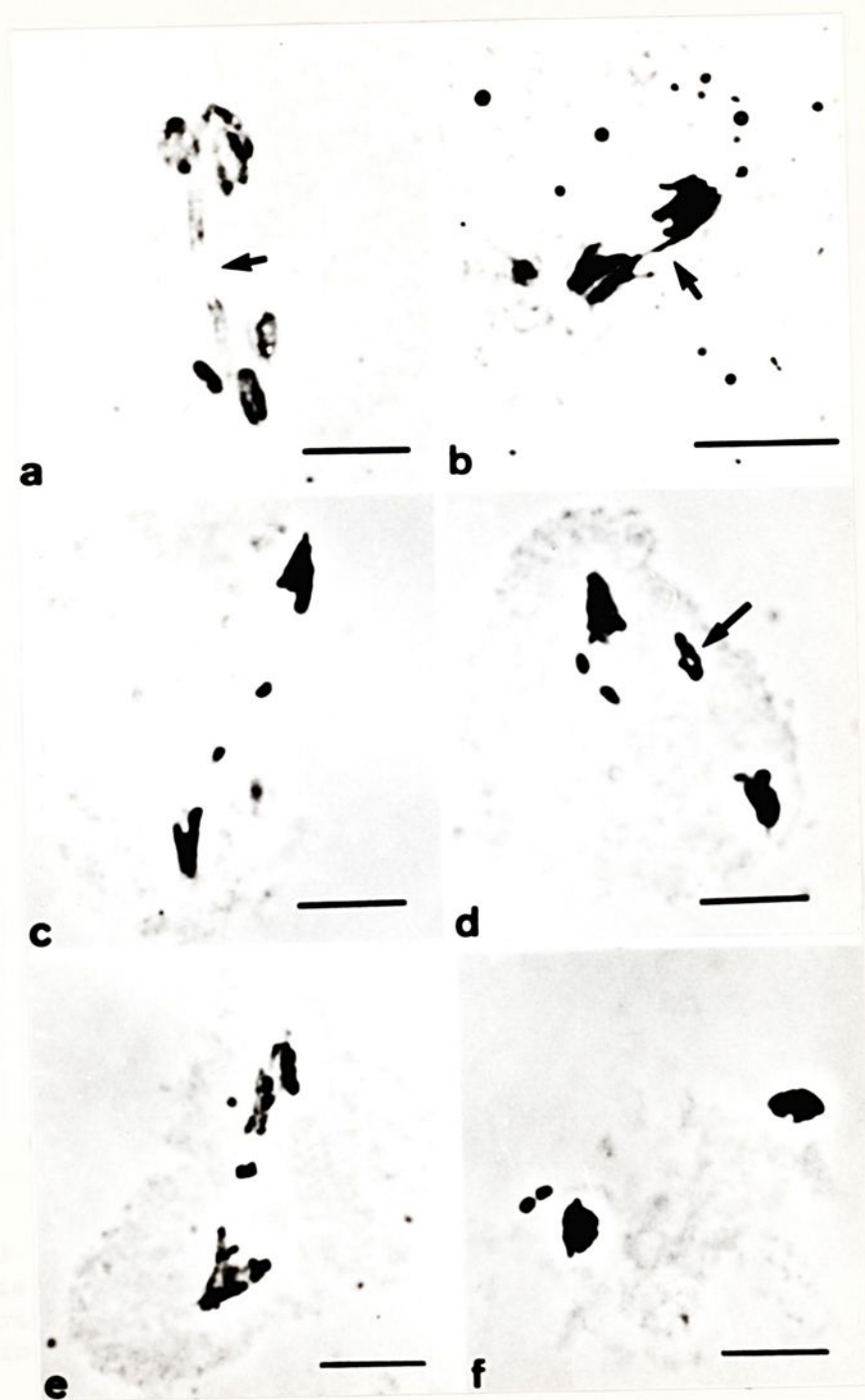


Figura 8. (a-f) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. Testículo. Meiose. a,b. anáfases mostrando pontes cromossômicas (setas); c-e. anáfases com um par de fragmentos cromossômicos retardatários. Em d há ainda outro cromossomo com migração retardatária (seta); f. telófase com o par de cromossomos retardatários formando micronúcleos.

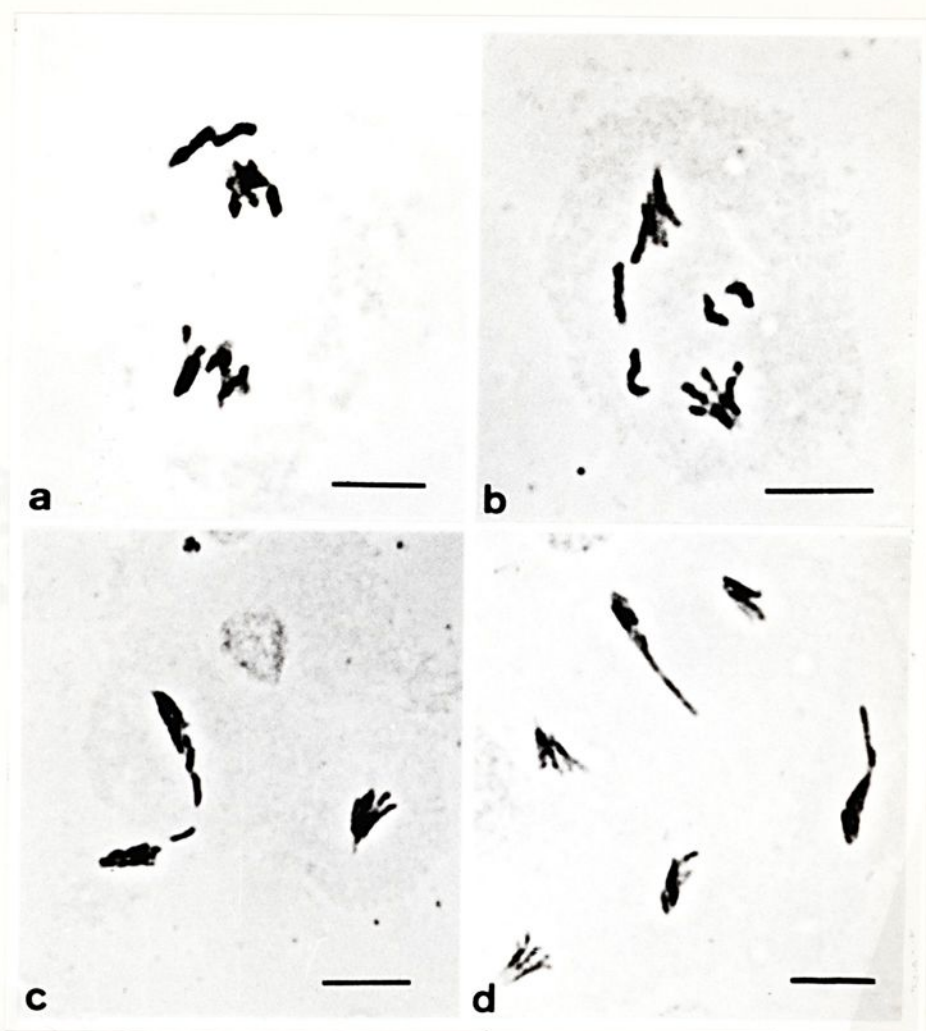


Figura 9. (a-d) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. Testículo. Meiose. a-d. células em anáfase. a,b. migração atípica dos cromossomos. c,d. pontes cromossômicas e divisões multipolares.

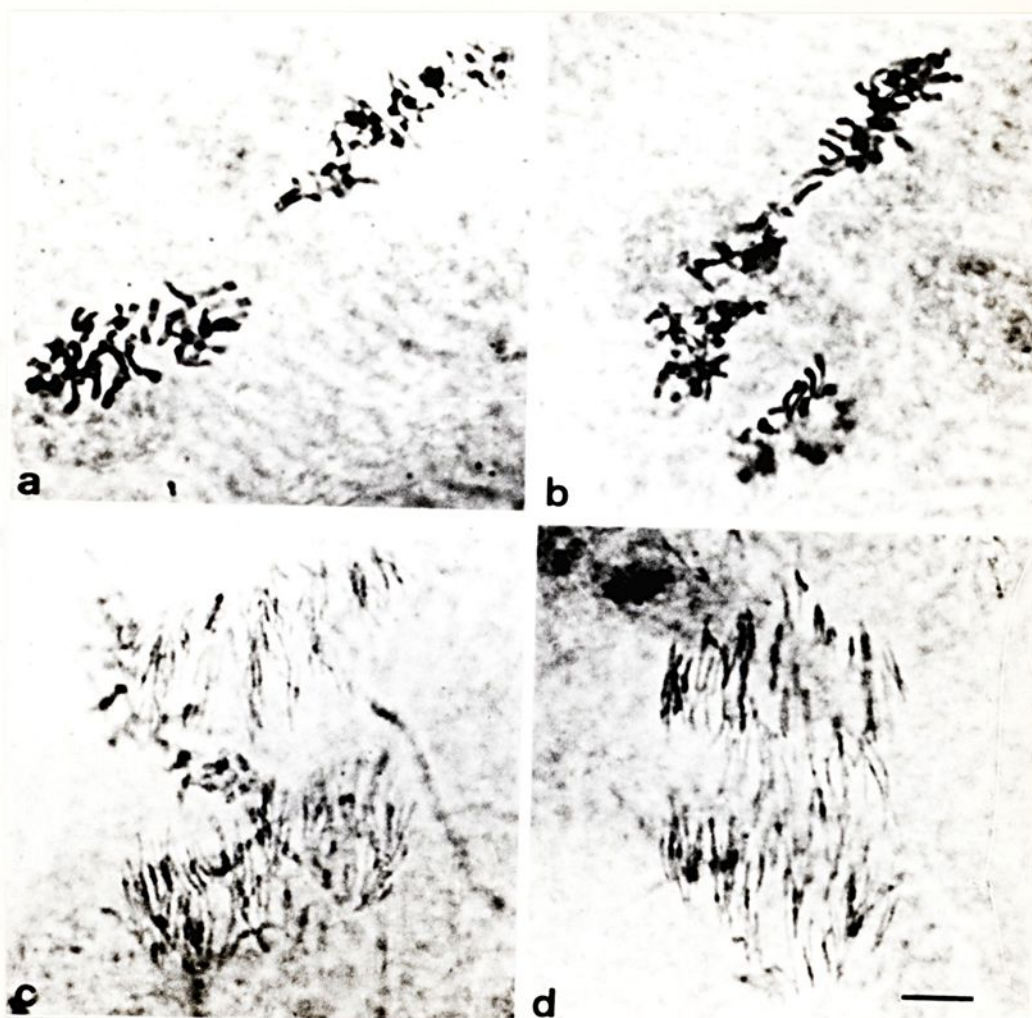


Figura 10. (a-d) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. Testículo. 2ª divisão meiótica. a,b. células poliplóides em metáfase. c,d. células poliplóides em anáfase.

associações entre cromossomos, às vezes difíceis de interpretar (Fig. 11).

As alterações descritas para células de testículo de *A. aegypti* de São José do Rio Preto não foram detectadas nos exemplares dessa espécie, procedentes de Marília. A figura 12 mostra fases da primeira e segunda divisões da meiose onde os únicos fenômenos morfológicos "especiais" são duas regiões talvez de falhas em uma das células (Fig. 12a).

O mesmo ocorreu na análise dos cromossomos de gônada larval dos mosquitos procedentes de Marília. O único tipo de anomalia detectada foi a presença de ponte cromossômica ou cromossomo retardatário (Fig. 13).

1.2. *Aedes fluviatilis*

A. Gânglios Cerebrais

As células metafásicas da mitose em *A. fluviatilis* também mostram pareamento somático e um cariótipo de 3 pares de cromossomos. Não foram observadas pontes cromossômicas, cromossomos retardatários ou outras alterações neste material (Fig. 14).

B. Testículos

Nas espermatogônias, os cromossomos mostraram o padrão normal de divisão mitótica (Fig. 15).

Nas células em meiose, porém, alguns indivíduos apresentaram quebras cromossômicas e um par de microcromossomos adicionais. Estas alterações foram observadas em células em

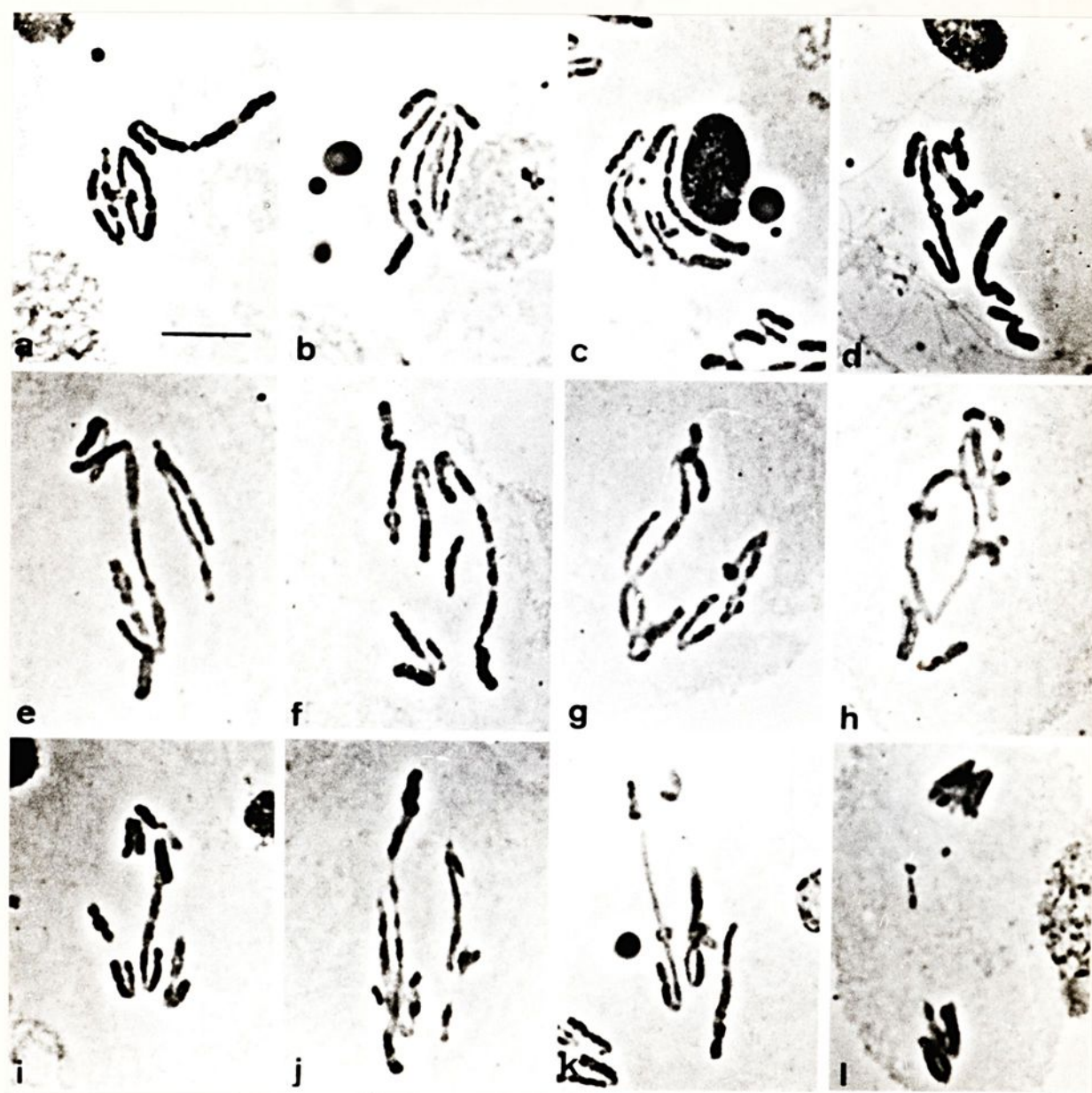


Figura 11. (a-l) - *Aedes aegypti* de São José do Rio Preto. Testículo. Meiose. Células em metáfase e anáfase de um mesmo indivíduo, portadoras de anomalias cromossômicas caracterizadas por fragmentação, descontinuidade, estiramento e associações múltiplas. Em l aparecem 2 pares de fragmentos cromossômicos retardatários.

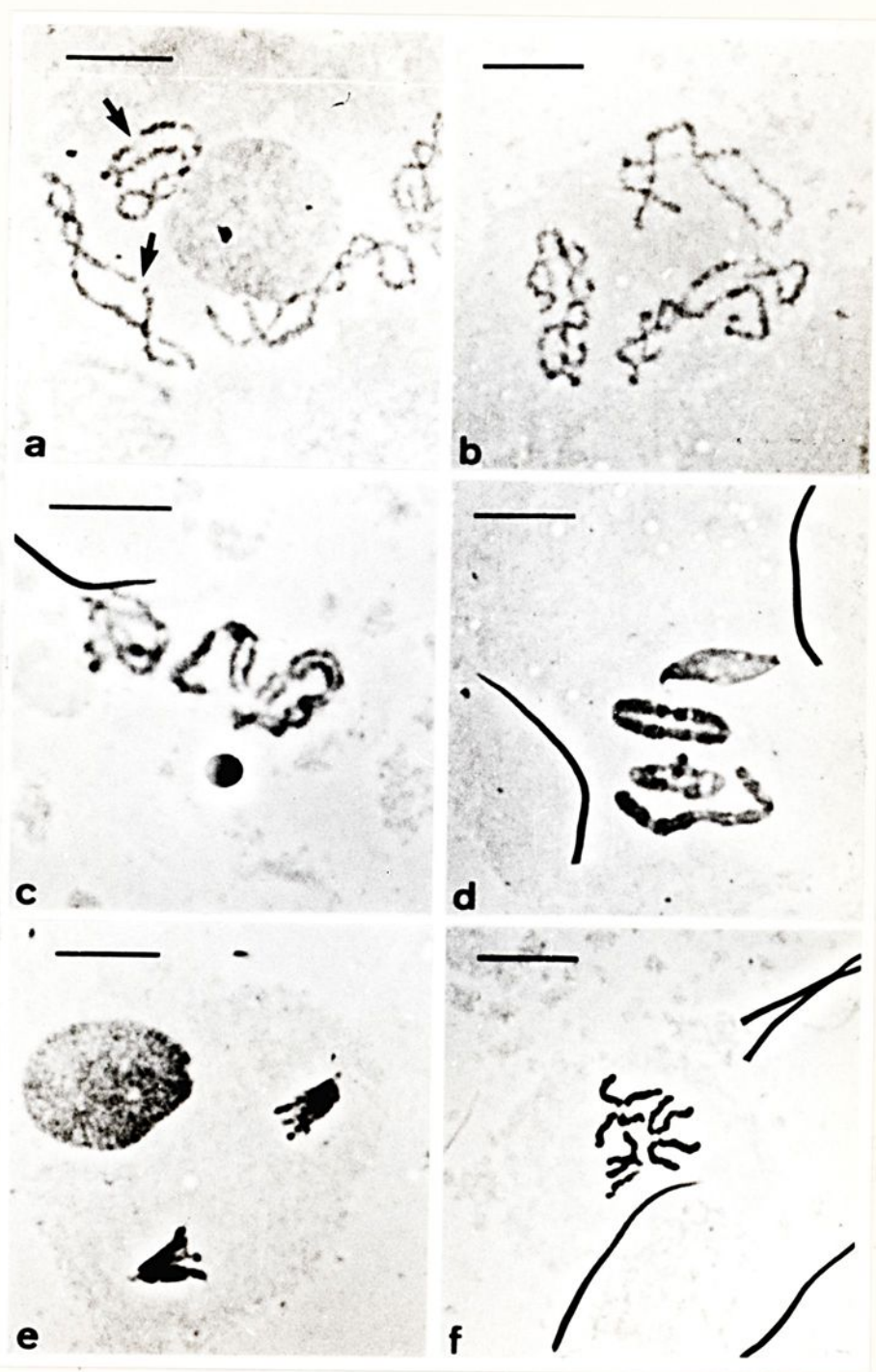


Figura 12. (a-f) - *Aedes aegypti* de Marília. Testículo. Meiose. a-c. prófase da 1ª divisão; d-e. metáfase e anáfase da 1ª divisão. f. metáfase da 2ª divisão. As setas em a indicam regiões de descontinuidade cromossômica.



Figura 13. (a-f) - *Aedes aegypti* de Marília. Gônada larval. Meiose. a-c. diplótено; d-f. anáfase. A seta em f indica ponte cromossômica.

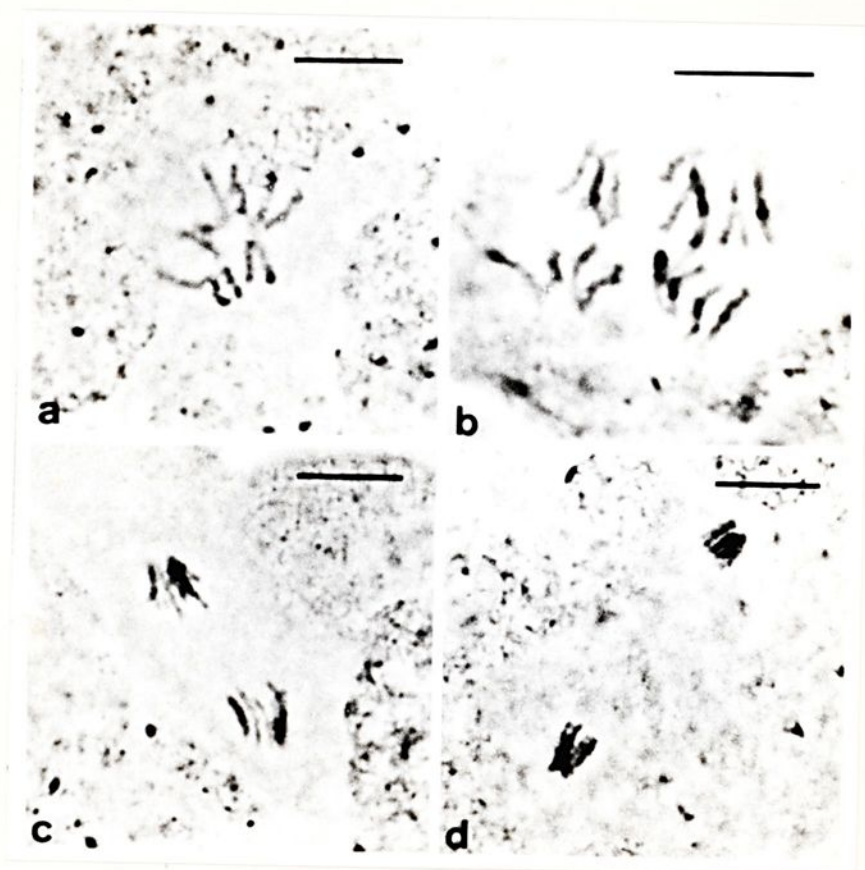


Figura 14. (a-d) - *Aedes fluviatilis*. Gânglios cerebrais. a. metáfase mostrando pareamento somático; b-d. anáfases.

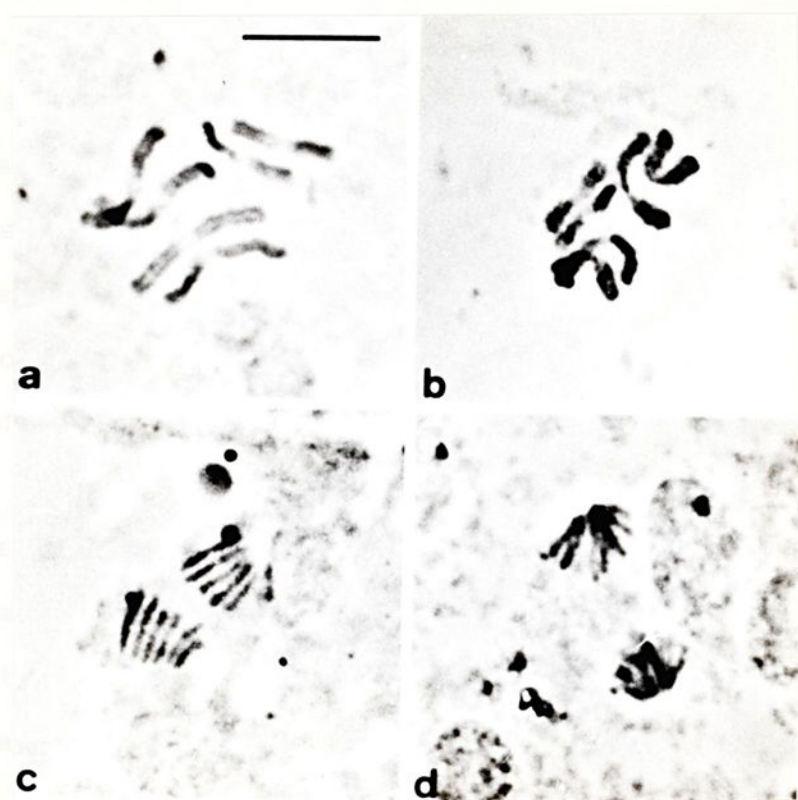


Figura 15. (a-d) - *Aedes fluviatilis*. Testículo. Mitose. a,b. metáfases com pareamento somático. Observam-se nitidamente as cromátides que compõem cada cromossomo; c-d. anáfases.

paquíteno, diplóteno, diacinese e metáfase (Fig. 16).

Algumas células também mostraram poliploidia e migração tripolar (Fig. 17).

A tabela 1 apresenta o número de células em divisão e suas médias, encontrados nos órgãos analisados dos indivíduos das duas espécies. Foram realizadas análises de variância para comparação das médias entre os cérebros e entre os testículos dos indivíduos das três procedências. A comparação dos testículos, foi significativa mostrando que esse órgão dos mosquitos de Marília possui maior número de células em divisão que as duas outras populações analisadas. A mesma comparação para os gânglios cerebrais não foi significativa. Apesar de não termos computado o número total de células dos órgãos analisados, o fato de terem sido utilizados os órgãos inteiros de cada indivíduo, permite que essas comparações sejam feitas.

Os dados mostram ainda que o número médio dessas células nas gônadas analisadas em *A. aegypti* de Marília é maior que o número encontrado nos testículos dos indivíduos da mesma procedência.

A tabela 2 apresenta as frequências de algumas anomalias verificadas nas células de gânglios cerebrais e testículo de *A. aegypti* de São José do Rio Preto, de testículo e gônada de *A. aegypti* de Marília e de testículo de *A. fluviatilis*. Os dados mostram que a frequência dessas aberrações em *A. aegypti* de São José do Rio Preto, tanto em relação aos gânglios cerebrais, quanto ao testículo, é maior do que nos mesmos órgãos e gônada larval da mesma espécie, procedente de Marília. Nos gânglios cerebrais dos mosquitos desta última população de *A. aegypti* e de *A. fluviatilis* não foi observada nenhuma alteração.

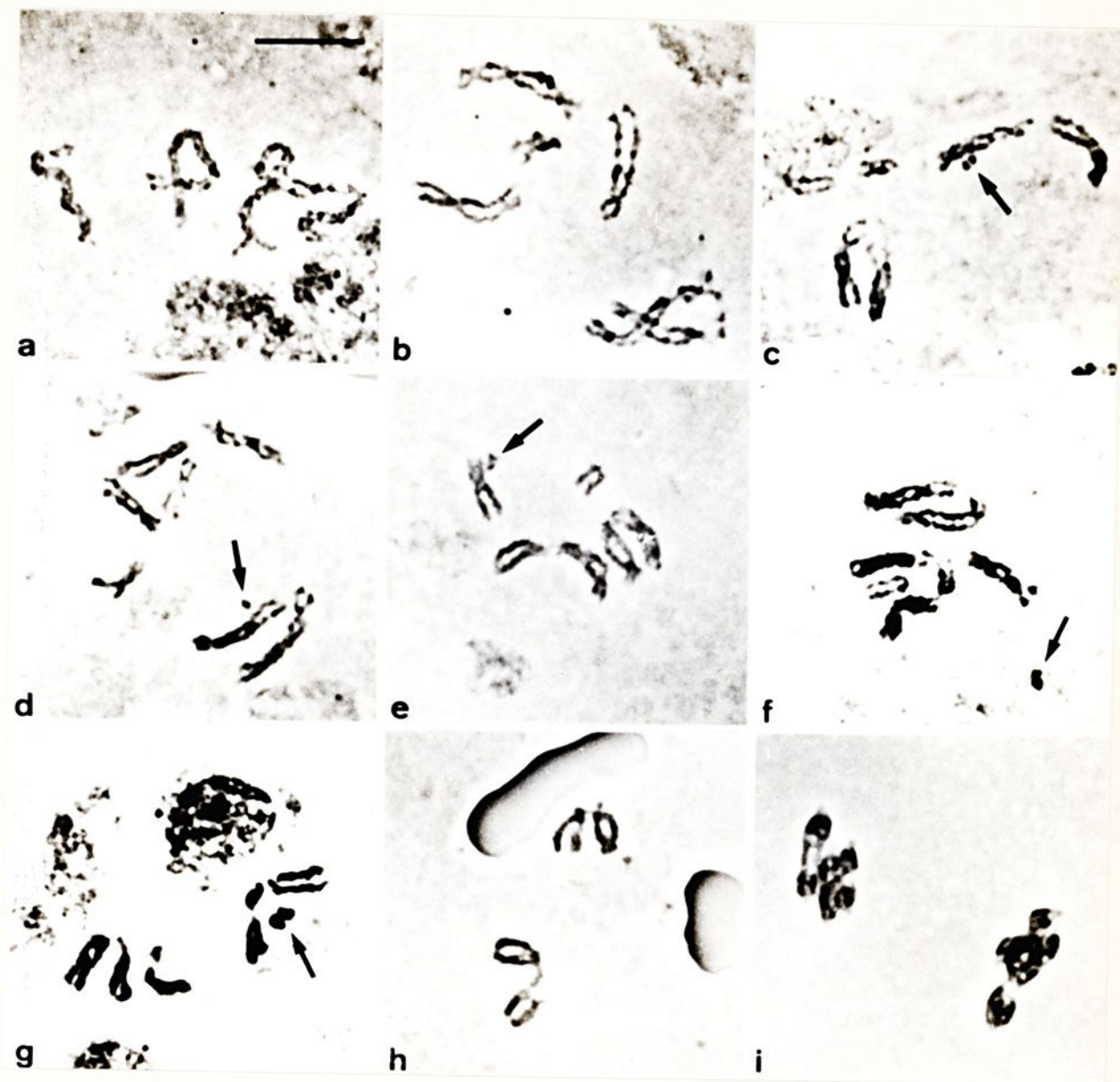
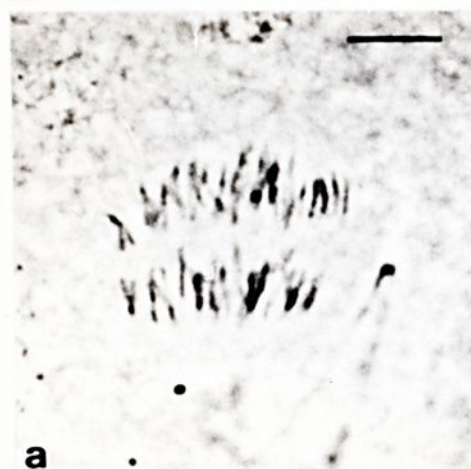


Figura 16. (a-i) - *Aedes fluviatilis*. Testículo. Meiose. a. complemento normal de célula em paquíteno; b-h. células em diplótено e diacinese mostrando cromossomos portadores de quebras, abrangendo um ou os dois membros do par. As setas em c-g indicam um par de cromossomos em ponto. Em h os dois pares de cromossomos mostram um dos elementos quebrados, aparentemente na região centromérica. i. telófase, em que a cromatina apresenta um aspecto de rede.

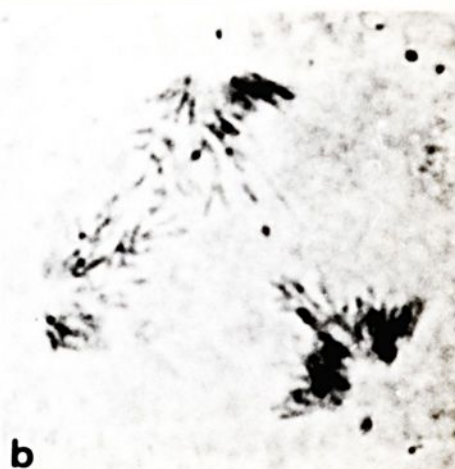
Tabela 1. Números totais e médias de células em divisão em células em divisão nos órgãos analisados dos indivíduos das duas espécies. (F para homogeneidade das médias; t para diferenças entre médias; ** = $P < 0,01$; N = nº de indivíduos).

Espécie	Procedência	Órgão	N	Células em Divisão
				total $\bar{X} \pm \text{SE}$

A. aegypti



a



b

A. fluviatilis

Figura 17. (a-b) - *Aedes fluviatilis*. Testículo. Meiose, Células poliplóides em anáfase da 23ª divisão. Em b, observa-se migração tripolar.

F(2;199) Cérebros 2.29

F(2;178) Testículos 8.54**

Tabela 1. Números totais e médios de células, em divisão, encontradas nos órgãos analisados dos indivíduos das duas espécies. (F para homogeneidade das médias; t para diferenças entre médias; ** = $P(0,01)$; N= nº de indivíduos.

Espécie	Procedência	Orgão	N	Células em divisão	
				Total	$\bar{X} \pm s\bar{X}$
<i>A. aegypti</i>	São José do	cérebro	42	1719	40,92 $\pm$ 3,8
	Rio Preto	testículo	77	3227	41,90 $\pm$ 3,3
	Marília	cérebro	32	1451	45,34 $\pm$ 7,6
		testículo	51	2972	58,27 $\pm$ 4,4
		gônada	25	3433	137,32 $\pm$ 31
<i>A. fluviatilis</i>	Araraquara	cérebro	37	1152	31,13 $\pm$ 2,3
		testículo	53	1911	36,06 $\pm$ 3,5
		F(2;108)	Cérebros		2,29
		F(2;178)	Testículos		8,54**
TOTAL					

Tabela 2. Tipos de anomalias e suas frequências e números de células e indivíduos portadores, nos diferentes órgãos analisados das duas espécies. T= número total; Min= número mínimo; Max= número máximo.

Anomalias	<i>Aedes aegypti</i>								<i>Aedes fluviatilis</i>	
	São José do Rio Preto				Marília				Araraquara	
	Cérebro(T= 42)		Testículo(T= 77)		Testículo(T= 51)		Gônada(T= 25)		Testículo(T=53)	
	Nº de indivíduos	Nº de células	Nº de indivíduos	Nº de células	Nº de indivíduos	Nº de células	Nº de indivíduos	Nº de células	Nº de indivíduos	Nº de células
		T(Min-Max)		T(Min-Max)		T(Min-Max)		T(Min-Max)		T(Min-Max)
Falhas ou quebras	-	-	11	76(3-12)	1	2	-	-	5	23(3-9)
Cromossomos retardatários	5	17(1-8)	21	82(1-11)	-	-	3	4(1-2)	-	-
Pontes	-	-	5	26(2-12)	-	-	-	-	-	-
Poliploidia	4	13(1-7)	4	26(2-12)	-	-	-	-	12	50(1-15)
Anáfases "espichadas"	-	-	14	73(1-20)	-	-	-	-	-	-
Cromossomos adicionais	-	-	-	-	-	-	-	-	6	72(3-35)
TOTAL	9	30	55	283	1	2	3	4	23	145
	(21,43%)	($\bar{X}$ = 3,34)	(71,43%)	($\bar{X}$ =5,15)	(1,96%)		(12%)	($\bar{X}$ =1,34)	(43,40%)	($\bar{X}$ = 6,30)

Em *A. aegypti* de São José do Rio Preto a frequência de indivíduos portadores de anomalias nos testículos é significativamente maior do que a dos indivíduos portadores de anomalias nos gânglios cerebrais. Portanto, de modo geral os testículos mostram uma maior frequência de indivíduos com aberrações do que os gânglios cerebrais em todos os casos analisados.

Nos mosquitos de Marília, contudo, as frequências de indivíduos e células afetadas tanto em testículo como em gônada larval foram extremamente baixas (respectivamente 1 e 3 indivíduos). Já em *A. fluviatilis* a frequência de indivíduos portadores de anomalias no testículo foi elevada, embora menor que a de *A. aegypti* de São José do Rio Preto.

As comparações das médias de células com aberrações nos diferentes órgãos, procedências e espécies, mostraram valores maiores para testículos de *A. aegypti* e *A. fluviatilis* (respectivamente 5,15 e 6,30) do que para os gânglios cerebrais de *A. aegypti* de São José do Rio Preto (3,34).

Paralelamente à baixa frequência de indivíduos portadores de anomalias em *A. aegypti* de Marília, a frequência de células portadoras, nesses indivíduos, também foi baixa.

1.3 - Núcleos Interfásicos

As figuras 18 e 19 mostram núcleos interfásicos de células de testículo de *A. aegypti* de São José do Rio Preto e *A. fluviatilis*, respectivamente. Nesses núcleos interfásicos foram observadas variações morfológicas nos grânulos de cromatina condensada ou heterocromatina, corados com orceína lacto-acética.



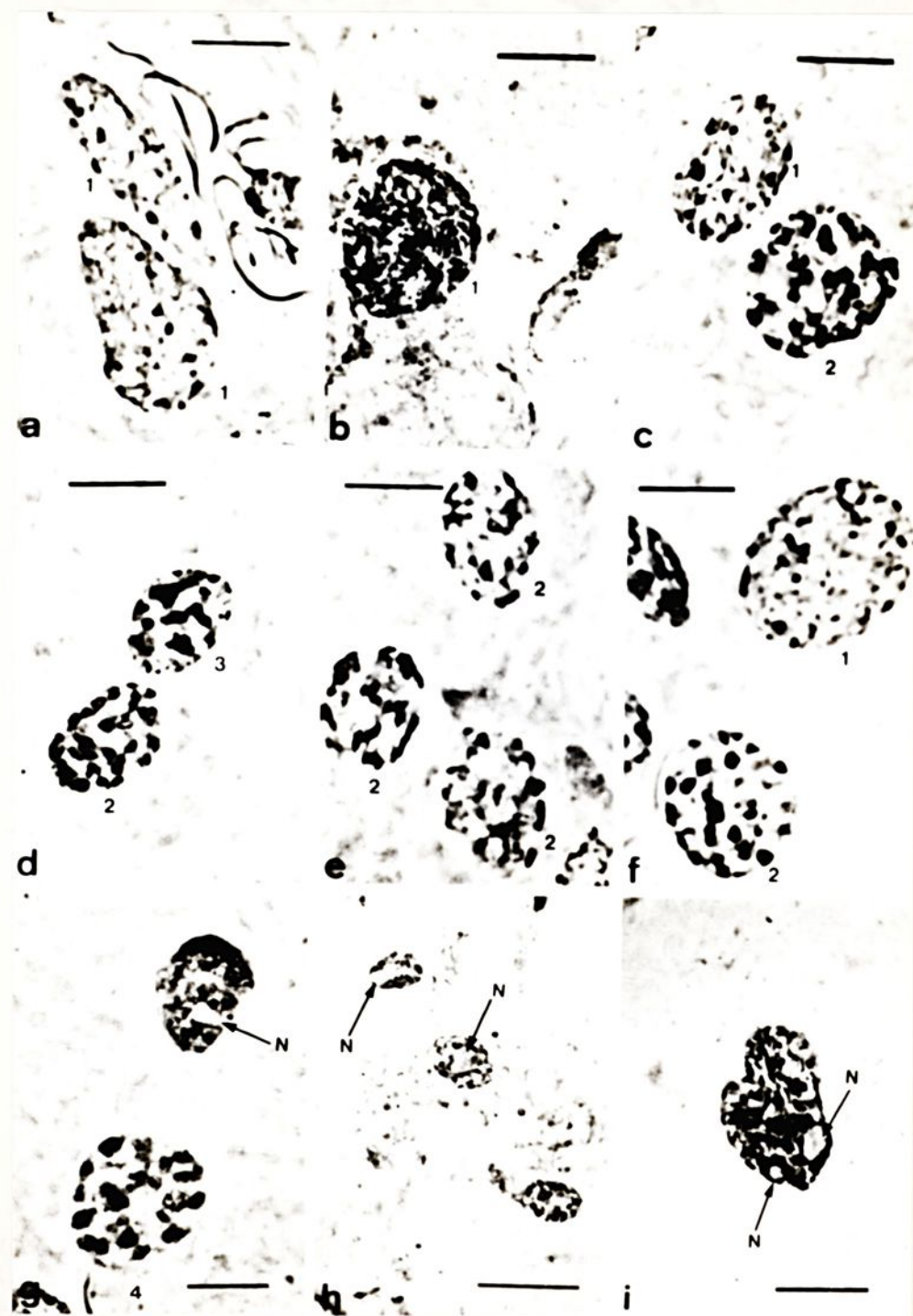


Figura 18. (a-i) - *Aedes aegypti*. Núcleos interfásicos em testículo. a-g. variação no tamanho dos cromocentros, numerados em ordem crescente. Setas com letra N, em g-i, indicam o nucléolo.

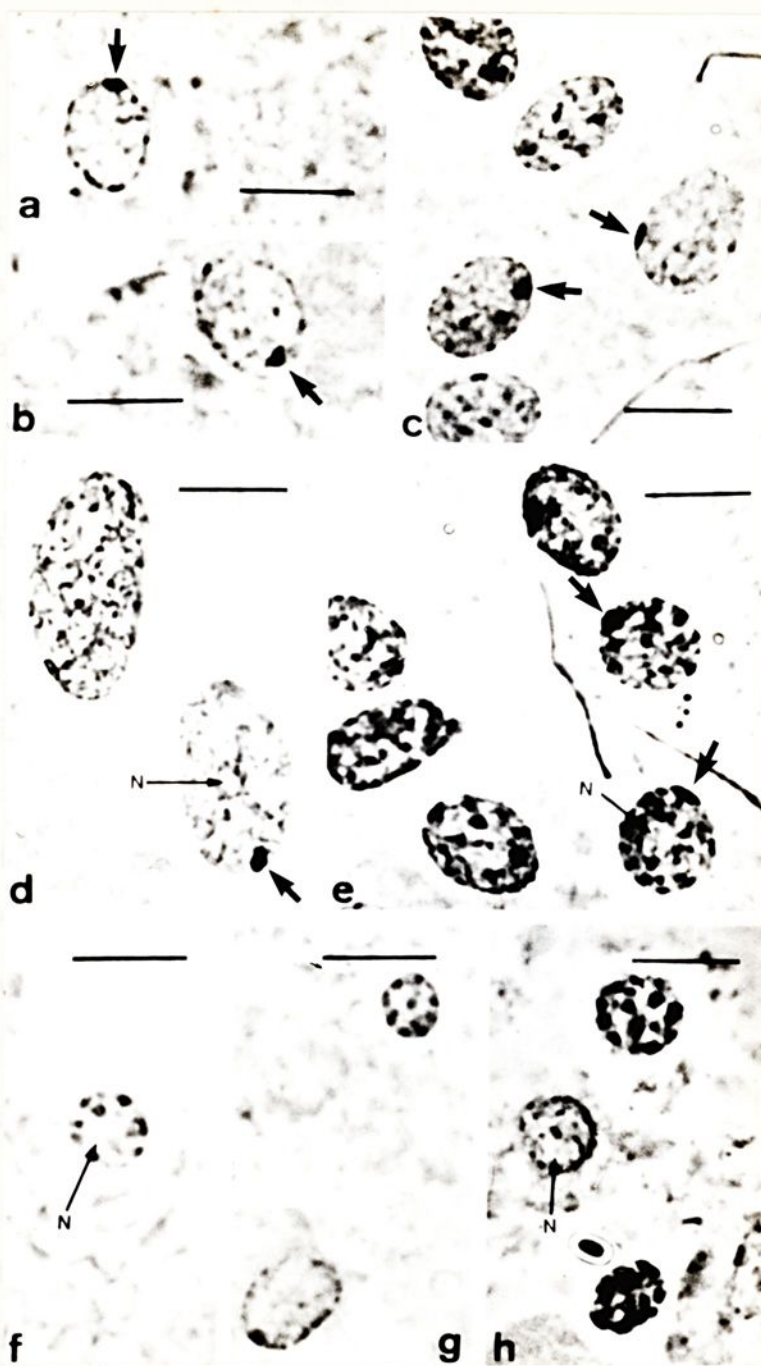


Figura 19. (a-h) - *Aedes fluviatilis*. Núcleos interfásicos em testículos. a-d. um único cromocentro grande e periférico apontado pelas setas; e-h. alguns ou muitos cromocentros grandes. Setas com letra N apontam o nucléolo.

Verifica-se que o tamanho dos grânulos heterocromáticos (cromocentros) varia em diferentes núcleos. Na figura 18 os grânulos estão numerados em ordem crescente de tamanho, de 1 a 4. O tamanho dos grânulos, porém, pode variar em um mesmo núcleo. Observa-se também uma distribuição periférica dos grânulos, quer sejam menores ou maiores. Nesses núcleos em intérfase, pode ser observada a presença de um ou dois nucléolos (Fig. 18g-i).

A figura 19 apresenta núcleos interfásicos de testículos de *A. fluviatilis*, em que também ocorrem variações morfológicas nos grânulos de cromatina condensada. Há núcleos que apresentam um único grânulo grande, deslocado para a periferia, e uma granulação fina no restante do núcleo, inclusive na periferia (Fig. 19a-d). Em alguns núcleos, além do grânulo maior, periférico, aparecem outros grânulos que também se destacam pelo tamanho (Fig. 19e) e ainda em outros, há um grande número de grânulos grandes, geralmente com distribuição periférica (Fig. 19f-h). Foi visto um nucléolo único em alguns dos núcleos (Fig. 19d-h).

2. Coloração com Nitrato de Prata

A coloração com nitrato de prata foi utilizada em lâminas de túbulos de Malpighi, gânglios cerebrais e testículos de *A. aegypti* procedente de Marília.

A. Túbulos de Malpighi

Nos túbulos de Malpighi foram observadas marcações pela prata em células grandes, provavelmente politênicas e em células pequenas, não politênicas, que possivelmente são células da traquéia

(Fig. 20). Nas primeiras, os padrões foram variáveis: marcações grandes, com aspecto de retículo frouxo emitindo prolongamentos para a periferia do núcleo (Fig. 20a); retículo com disposição circular em torno de uma região clara (Fig. 20b) ou associada à região clara, sem contorná-la inteiramente (Fig. 20c). Quanto às células não politênicas, a marcação observada foi predominantemente única e, de modo geral, seu tamanho acompanhou o tamanho do núcleo, sendo maior nos núcleos maiores. Marcação granular (de 1 a 3 grânulos) também foi observada em alguns núcleos (Fig. 20d,e).

B. Gânglios Cerebrais

Nos núcleos das células dos gânglios cerebrais, observou-se predominantemente uma única marcação (Fig. 21). Seu tamanho, não era diretamente proporcional ao tamanho do núcleo, como foi observado nas células não politênicas em preparações de túbulos de Malpighi. Em alguns núcleos foram observadas duas marcações grandes ou sob a forma de vários grânulos pequenos, dispostos em fileira. Não foram observadas células em divisão nas lâminas coradas com nitrato de prata.

C. Testículos

Nos testículos, os nucléolos das células interfásicas ou em início de prófase I, coram-se diferencialmente em marrom (Fig. 22). Nas células em prófase mais adiantada (zigóteno) já não se verifica essa coloração característica nos nucléolos. Estes coram-se em amarelo claro como ocorre com os cromossomos nas mesmas células (Fig. 22a,b). Quanto aos cromossomos em metáfase espermatogonial verificou-se que não apresentam marcação específica das regiões

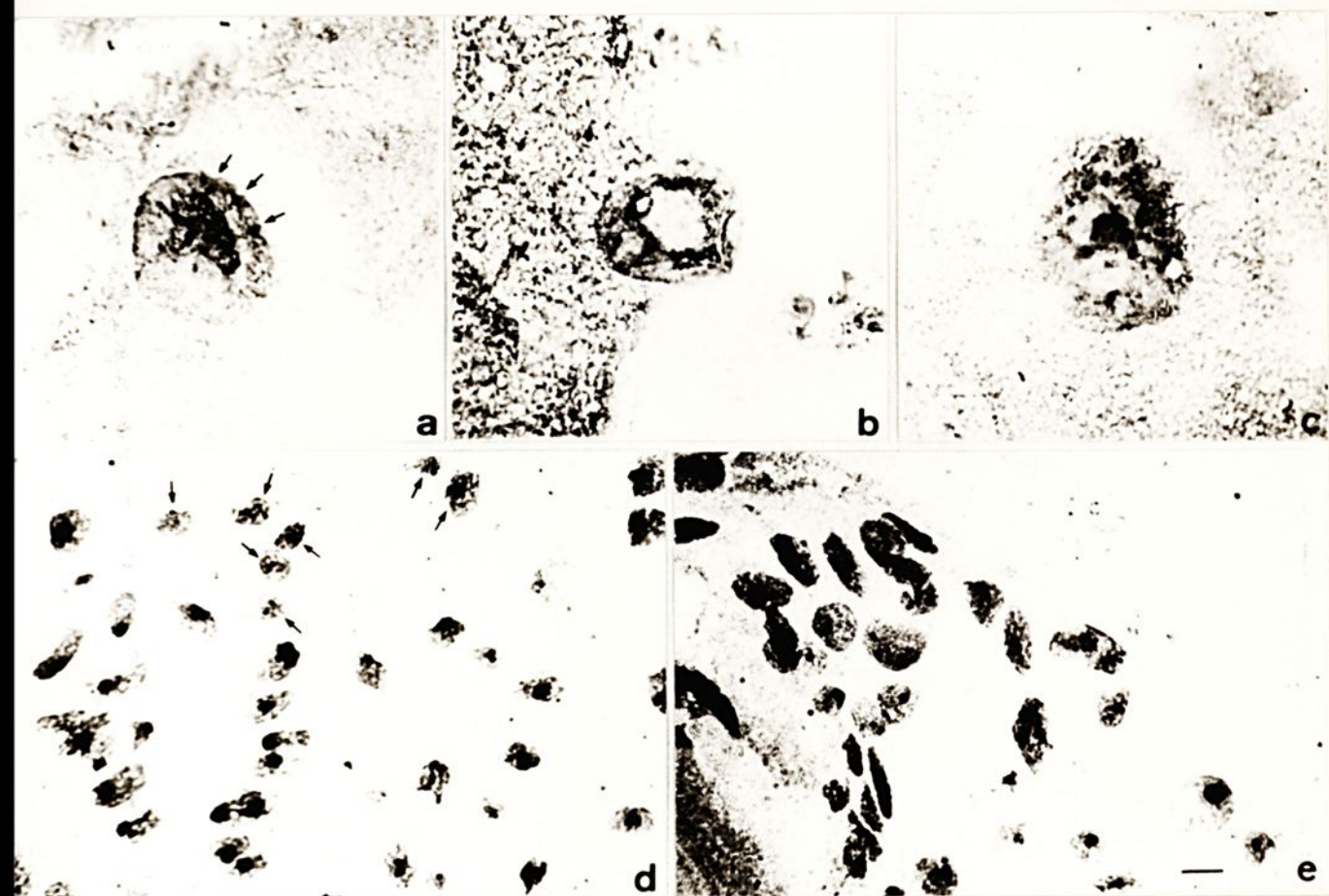


Figura 20. (a-e) - *Aedes aegypti* de Marília. Túbulos de Malpighi. Coloração com nitrato de prata. a-c. células politênicas mostrando 3 padrões de marcação: reticular (a), circular em torno de uma região clara (b) e associada à região clara sem contorná-la (c). As setas em a apontam prolongamentos ligando a região corada à periferia do núcleo. d-e. células não politênicas. Em geral, o nucléolo é único e seu tamanho é proporcional ao tamanho do núcleo. Setas em e apontam núcleos com marcação granular variando de 1 a 3 grânulos.

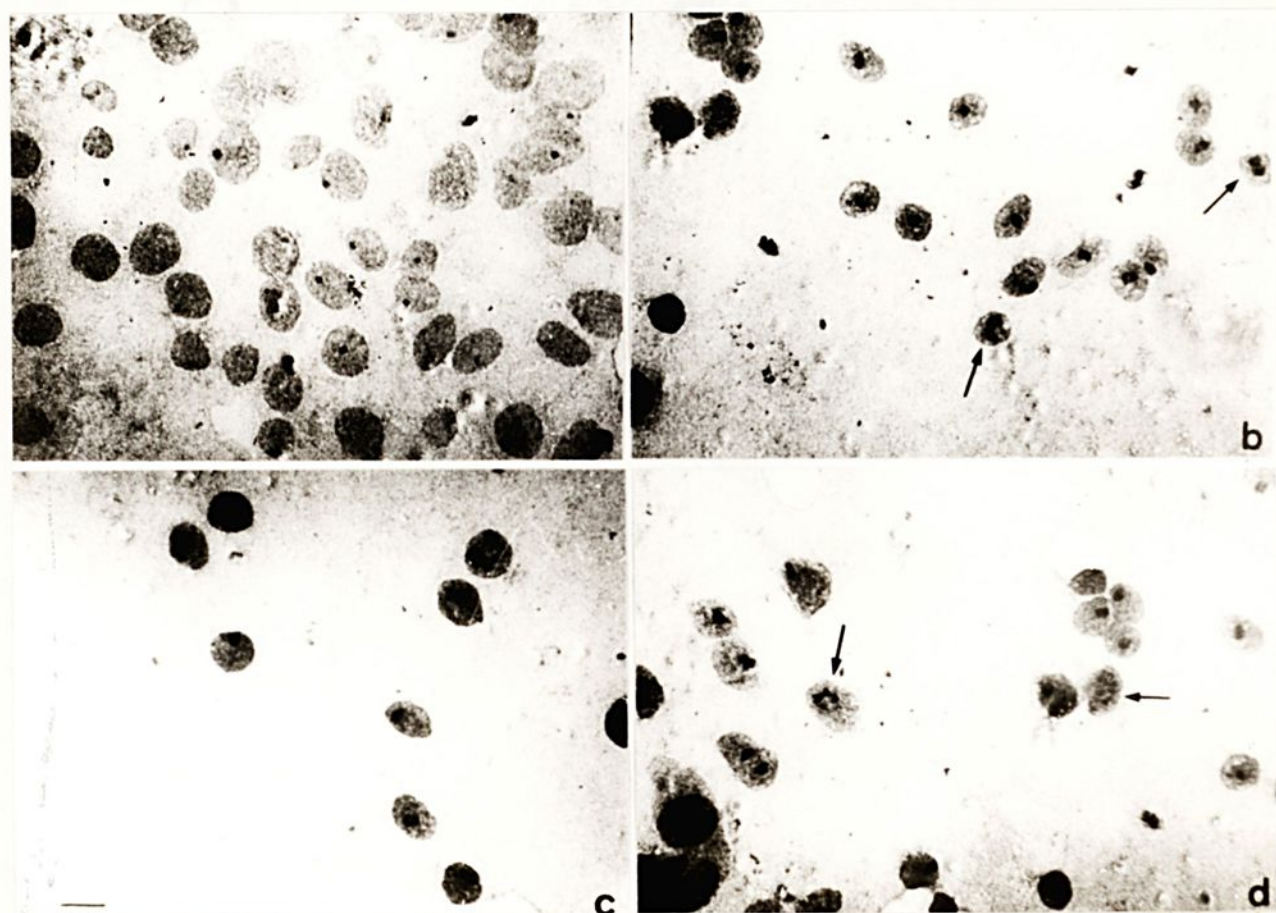


Figura 21. (a-d) - *Aedes aegypti* de Marília. Gânglios cerebrais. Coloração com nitrato de prata. Células interfásicas mostrando predominantemente uma única marcação. Observa-se que, em a, embora os núcleos sejam maiores, as marcações são menores que em b. As setas em b e d apontam marcações duplas ou granulares.

organizadores. Pólos laterais. Contorno da região centromérica dos 3 pares foram marcadas (Fig. 22a).

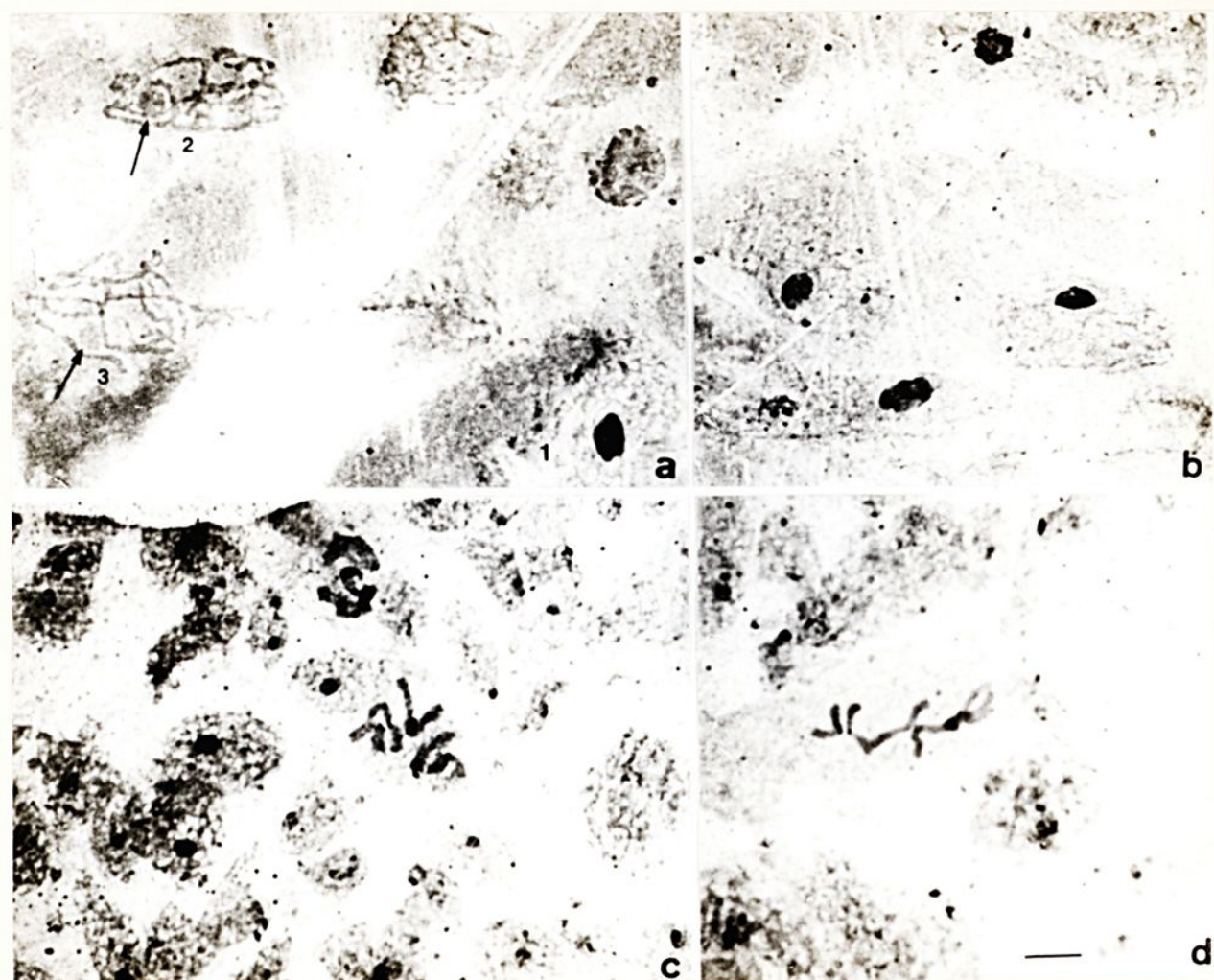


Figura 22. (a-d) - *Aedes aegypti* de Marília. Testículos. Coloração com nitrato de prata. a. célula interfásica ou em início de divisão com nucléolo fortemente corado (1) e células aparentemente em zigóteno com nucléolo não corado diferencialmente (setas em 2 e 3). b. células interfásicas ou em início de prófase com nucléolos corados diferencialmente. c,d. metáfases mitóticas mostrando coloração diferencial das regiões cromossômicas centroméricas.

IV. DISCUSSÃO

Segundo a literatura, todas as espécies de mosquitos analisadas até o presente (num total de mais de 2960), possuem três pares de cromossomos com pequenas diferenças morfológicas (ver, por exemplo, MOTARA & RAI, 1978). O gênero *Aedes* inclui-se neste resultado.

Conforme McDONALD & RAI (1970), em *Aedes aegypti* o número diplóide é seis, sendo, os três pares, diferentes em sua morfologia. Ainda conforme os mesmos autores, o menor par, designado como cromossomo 1, possui o loco para a determinação do sexo. Esse locus, designado m (sendo M/m os machos e m/m as fêmeas) está situado próximo do centrômero do cromossomo mencionado (CRAIG & HICKEY, 1967). Estudos citológicos mostraram que ele é herdado invariavelmente com o centrômero (NEWTON et al., 1974).

O cromossomo 2 é o maior da espécie e o cromossomo 3 é intermediário no tamanho. Os cromossomos 1 e 2 são metacêntricos enquanto o cromossomo 3 é submetacêntrico e possui uma constrição secundária no seu braço longo (McDONALD & RAI, 1970).

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam as observações morfológicas apresentadas pelos autores acima referidos e mostram que, pelo tamanho e pelo número, os cromossomos de *Aedes* são muito bons para estudos citogenéticos. Entretanto, embora no presente trabalho não tenham sido realizadas medidas dos braços cromossômicos, as observações dos cromossomos em metáfase e anáfase parecem indicar, às vezes, que os três pares são metacêntricos. Os resultados foram os mesmos para *A. aegypti* e *A. fluviatilis*. A explicação pode estar em que, segundo RAI (1963b), para *A. aegypti*,

"o cromossomo 3 é apenas levemente metacêntrico".

Quanto a *A. fluviatilis*, pelo levantamento bibliográfico realizado, esta é a primeira vez que seu cariótipo é descrito.

Todas as espécies de *Aedes* já descritas mostraram os mesmos 3 pares, com algumas variações no tamanho dos braços e portanto na forma dos cromossomos. Por exemplo, *Aedes mediovitatus*, possui os três pares submetacêntricos (HARTBERG et al., 1985). Entretanto, segundo MARCHI & RAI (1986) no gênero *Aedes* as informações sobre o complemento cromossômico, obtidas pelas técnicas tradicionais (orceína e carmim) são muito limitadas.

Foram feitas tentativas de melhor identificar os cromossomos das espécies desse organismo por meio das técnicas de bandamento. NEWTON et al. (1974) e MOTARA & RAI (1977) analisaram esses cromossomos pela técnica de banda C que utiliza o Giemsa como corante, tendo conseguido obter padrões específicos para os cromossomos sexuais. Também pelos padrões de banda C, MOTARA & RAI (1978) conseguiram separar, em grupos distintos, 10 espécies do subgênero *Stegomyia*. Na maioria das espécies analisadas, entre as quais encontra-se *A. albopictus* e *A. aegypti*, os homólogos do par menor (par sexual) eram distinguíveis um do outro, no sexo masculino, sendo o padrão de *A. albopictus* diferente do padrão de *A. aegypti*. *A. mascarensis*, uma espécie muito próxima de *A. aegypti* mostrou padrões idênticos de banda C em ambos os sexos.

Segundo MOTARA & RAI (1977), nos cromossomos de *A. aegypti*, além de uma banda C centromérica, presente em todos os cromossomos das fêmeas e dos machos, exceto no cromossomo Y, há uma banda intercalar presente nos cromossomos X e Y. Essa banda C intercalar do cromossomo X de *A. aegypti* é suprimida nos híbridos

machos e fêmeas do cruzamento entre fêmeas *A. aegypti* e macho *A. mascarensis*. Quando híbridos machos, portadores do cromossomo X de *A. aegypti* com banda C suprimida, são cruzados com fêmea *A. aegypti*, a banda C intercalar aparece em ambos os cromossomos X das filhas. Entre os descendentes do cruzamento que têm o Y de *A. mascarensis*, cerca de metade são machos "normais" com supressão da banda C intercalar no cromossomo X, enquanto o restante são intersexos com bandas C intercalares expressas no X. Uns poucos recombinantes são machos férteis com uma banda intercalar no X, ou intersexos com X e Y homozigotos para banda C intercalar. MOTARA & RAI (1977) concluíram que as bandas centroméricas observadas representam áreas de heterocromatina constitutiva (nunca variam sua expressão) e as bandas intercalares, heterocromatina facultativa, podendo ser geneticamente ativadas (neste caso, a banda C é suprimida). A banda C de um cromossomo X de *A. aegypti* é suprimida somente se ele é de origem materna e quando seu homólogo é um cromossomo X ou Y de origem paterna.

Padrões de banda Q, H e R foram também analisados em *A. aegypti*, *A. mascarensis* e *A. albopictus* por MARCHI & RAI (1986). Foi encontrada grande homologia de bandas entre as 3 espécies e, dentro de cada espécie, entre os sexos.

Algumas características são destacáveis no cariótipo das espécies analisadas no presente trabalho, utilizando a coloração com orceína lacto-acética. Uma delas é o fenômeno denominado pareamento somático que ocorre entre cromossomos mitóticos. Esse fenômeno é muito comum entre os Diptera, mas segundo NEWTON *et al.* (1974), a intensidade com que aparece nos Culicinae é excepcional. MUKHERJEE & REES (1970) descrevem o pareamento somático em *Aedes* como



envolvendo uma atração permanente e íntima entre cromossomos homólogos durante a mitose. Na maioria dos tecidos de animais e plantas, os cromossomos parecem ser independentes durante a divisão mitótica, e uma íntima associação dos homólogos não é comum. Na gametogênese animal, o pareamento dos homólogos é uma característica somente da prófase I e estudos dos estágios embrionários iniciais não indicaram pareamento somático (KITZMILLER, 1953).

Nossas observações em *A. aegypti* mostram que, nas metáfases mitóticas, tanto em gânglios cerebrais como em testículos, ocorre pareamento somático, inclusive com uma ligação das regiões centroméricas dos cromossomos homólogos pareados, muito frequente. Observamos também que o pareamento somático pode, aparentemente, permanecer nos cromossomos anafásicos (ver figura 1d).

O pareamento somático nos cromossomos em anáfase mitótica já havia sido descrito por KITZMILLER (1953). Segundo este autor, este fenômeno é de considerável interesse em termos de atração e repulsão de homólogos, movimento dos cromossomos na mitose e meiose e duplicação cromossômica.

Muitos autores têm questionado a existência das fases de leptóteno e zigóteno da prófase I da meiose em mosquitos. Por exemplo, BRELAND et al. (1964), não encontraram células nestes estágios em machos do mosquito *Culiseta inornata*. MESCHER & RAI (1966) também informaram não terem encontrado essas fases em *Aedes aegypti*, assim como MUKHERJEE & REES (1970) e SMITH & HARTBERG (1974) não as encontraram em *Aedes dorsalis* e *Aedes albopictus*, respectivamente.

Segundo MESCHER & RAI (1966) a ausência desses estágios, resulta do fato de que os cromossomos, no início da prófase I, retêm



o íntimo pareamento de anáfases e telófases mitóticas anteriores. Ainda segundo esses autores, mesmo durante o paquíteno, os cromossomos ainda estão muito ligados, não sendo vistos duplicados. Portanto, no paquíteno os cromossomos pareados são opticamente um só e estão completamente pareados exceto em algumas poucas regiões que aparecem "abertas". Os autores ainda informam que o paquíteno tem uma duração relativamente longa, que as células nesta fase foram observadas em quase todas as preparações de testículo de pupa de *Aedes aegypti* e que a repulsão entre os homólogos, na fase de diplóteno, é maior na região centromérica sendo os cromossomos mantidos juntos somente nas regiões de quiasma. Entretanto, nossos dados mostram núcleos em início de prófase meiótica em que existem filamentos cromossômicos únicos indicativos de que leptóteno e zigóteno são presentes, como também é possível ver a dualidade dos cromossomos pareados tanto em zigóteno como em paquíteno (ver Fig. 5).

Uma característica interessante observada nos cromossomos metafásicos mitóticos de *A. aegypti* e *A. fluviatilis*, neste trabalho, foi a presença de faixas transversais, unindo as cromátides irmãs, como se fossem bandas ou cromômeros ligados. Em algumas metáfases da 1ª divisão de *A. aegypti* também foi possível ver estas faixas unindo cromátides irmãs. Não se descarta a possibilidade de que se trata de artefato de técnica. Entretanto, a frequência com que esta característica foi observada, pode ser indicativa de que reflete uma diferenciação ao longo do cromossomo.

Nos estágios de prometáfase, foi descrito em algumas espécies de mosquitos, um fenômeno chamado de estiramento (stretch). Este fenômeno foi observado por BRELAND et al. (1964) em *Culiseta*



inornata e por MESCHER & RAI (1966) em *Aedes aegypti*.

BRELAND et al. (1964) sugerem que a ocorrência de prometáfases com cromossomos "esticados" pode estar relacionada com a filogênia dos Diptera, sendo uma evidência adicional para suportar o ponto de vista de que os Diptera derivaram dos Mecoptera e não dos Neuroptera, como, segundo este autor, WHITE (1949) defende. Embora MESCHER & RAI (1966) tenham encontrado este fenômeno em *Aedes aegypti*, eles sugerem que não deve ser colocada muita confiança filogenética ou taxonômica neste caráter.

Prometáfases "esticadas" não foram observadas por MUKHERJEE & REES (1970) em *Aedes dorsalis* e nem por JOST (1971) em *Aedes albopictus*. SMITH & HARTBERG (1974) também não encontraram prometáfases "esticadas" em *Aedes albopictus* e concordam com RAI et al. (1970, apud SMITH & HARTBERG, 1974) que este fenômeno poderia ser resultado do processo de fixação.

No presente trabalho não encontramos esse fenômeno, em nenhuma das espécies analisadas.

Segundo MESCHER & RAI (1966), o número de quiasmas por bivalentes em *Aedes aegypti* varia de 1 a 2. Contudo, nossas observações em cromossomos em diplóteno e diacinese, mostrando muitas regiões de contato (5 ou mais) entre os homólogos, sugerem que aquele número pode ser maior.

Vários autores fazem referência à movimentação assincrônica dos cromossomos na anáfase I, sendo que o par menor (cromossomo 1) se separa primeiro.

Segundo BRELAND et al. (1964), na grande maioria das anáfases de *Culiseta inornata* os cromossomos menores se separam primeiro. Os autores afirmam ser comum que esta separação se inicie

e até mesmo se complete antes de qualquer movimento óbvio nos cromossomos maiores. JOST (1971) encontrou situação semelhante em *Aedes albopictus*, MUKHERJEE & REES (1970) em *Aedes dorsalis* (ocasionalmente) e SMITH & HARTBERG (1974) também em *A. albopictus* (aproximadamente metade das células em divisão por eles observadas). Já na anáfase II, os 3 cromossomos movem-se juntos para pólos opostos, isto é, o movimento é sincrônico na maioria dos mosquitos (MESCHER & RAI, 1966).

No presente trabalho, também foi possível observar em *A. aegypti* e *A. fluviatilis* a separação assincrônica dos cromossomos, em algumas células, na anáfase I da meiose e também na anáfase da mitose. Entretanto, na anáfase I nem sempre o cromossomo menor se separa antes dos demais, talvez em decorrência da presença ou não de quiasmas.

Segundo MESCHER & RAI (1966), uma das maiores dificuldades encontradas nas preparações de testículo de *Aedes aegypti* são os cromossomos pegajosos ("stickness"), notados com maior frequência na metáfase I e anáfase I. Os cromossomos aderem-se uns aos outros, chegando a formar uma única massa cromática.

Outros autores também mencionaram cromossomos metafásicos e anafásicos "pegajosos" em *A. dorsalis* (MUKHERJEE & REES, 1970) e *A. albopictus* (SMITH & HARTBERG, 1974).

O fato de não termos encontrado cromossomos com essas características, sugere que os cromossomos "pegajosos" podem ser decorrentes de artefato de técnica.

A análise dos núcleos interfásicos de *A. aegypti* e *A. fluviatilis*, corados com orceína, realizada no presente trabalho, mostrou variação quanto aos padrões de grânulos de cromatina entre



células e entre as espécies. O padrão de um grânulo grande e periférico observado em *A. fluviatilis* não foi encontrado em *A. aegypti*. Entre as células da primeira espécie, esse grânulo grande permaneceu destacado (junto com uma granulação fina), até que muitos grânulos grandes apareceram. Em *A. aegypti* observou-se: 1- apenas uma granulação fina distribuída em todo o núcleo, inclusive na periferia do mesmo ou 2- alguns grânulos grandes destacando-se dos demais ou ainda 3- muitos grânulos grandes dispostos na periferia e no interior do núcleo.

Os grânulos grandes, observados nos núcleos interfásicos de *A. aegypti* e *A. fluviatilis* correspondem aos cromocentros, descritos na literatura para muitas espécies de outros organismos, como constituídos de heterocromatina.

O termo heterocromatina foi criado por HEITZ (1928 apud JOHN, 1988) para descrever segmentos cromossômicos, ou em alguns casos, cromossomos inteiros que mantêm um estado condensado durante a intérfase do ciclo celular mitótico e aparecem no núcleo interfásico como cromocentros. HEITZ demonstrou que as estruturas que formam cromocentros na intérfase eram regiões cromossômicas específicas que não descondensavam na telófase da divisão mitótica. Essas regiões, portanto, apresentavam uma condensação diferencial, ou heteropicnose e, diferentemente da eucromatina, não desenovelavam na telófase do ciclo mitótico.

Desde o tempo de HEITZ, segundo JOHN (1988) o termo cromocentro tem sido usado de dois modos diferentes: 1- para descrever regiões condensadas individuais dentro dos núcleos interfásicos e, 2- para descrever agregados de regiões condensadas. Numa situação extrema, todos os segmentos condensados podem se

fundir numa só estrutura ou pode haver muitos cromocentros distintos. As interações responsáveis pela produção de cromocentros, agregados ou isolados, variam com o tipo de célula e a fase do desenvolvimento, dentro e entre as espécies.

A definição original proposta por HEITZ admitia que toda a cromatina condensada intermitótica pertencia a uma única classe. Ainda de acordo com JOHN (1988) isto estava incorreto. A condensação ou não condensação da cromatina reflete diferentes níveis de interação do DNA com proteínas, resultando que a cromatina condensada é transcricionalmente inativa. Entretanto, a cromatina condensada pode incluir DNA permanentemente incapaz de transcrição ou temporariamente e reversivelmente inativado. A primeira, forma regiões de heterocromatina constitutiva (que geralmente se coram pela banda C) e a segunda, a heterocromatina facultativa que se condensa de forma tecido-específica ou durante o desenvolvimento. De acordo com JOHN (1988) o fato do DNA da heterocromatina constitutiva ter características distintas, faz com que a palavra heterocromatina, usada para descrever a eucromatina que é facultativamente inativada, seja incorreta e desnecessária.

Dados da literatura mostram que os cromocentros não se formam em todos os tipos celulares. Isto parece ser verdadeiro para a heterocromatina constitutiva, como para a eucromatina facultativamente heterocromatinizada. Por exemplo, na *Drosophila melanogaster*, 29% do genoma da fêmea e 35% do genoma do macho são compostos de heterocromatina constitutiva. Entretanto, nenhum cromocentro está presente nos núcleos em clivagem do embrião. Regiões heteropicnóticas aparecem posteriormente no desenvolvimento, mas, há uma perda desses cromocentros se as células são injetadas

num ovo não fertilizado, mostrando que a heterocromatina constitutiva nesta espécie, tem uma capacidade reversível de formar cromocentros. A mesma revisão de JOHN (1988) mostra que situação semelhante ocorre em muitos mamíferos, incluindo camundongos e ratos.

Uma outra situação foi encontrada na glândula tireóide de **Microtus agrestis** em que 85% das células inativas contêm células com dois grandes cromocentros, enquanto que nas regiões ativas da mesma glândula não há cromocentros grandes, tendo apenas um corpúsculo cromatínico sexual. O tratamento com hormônio estimulante da tireóide ou com metiltiouracil tirostático leva a um aumento da glândula tireóide acompanhado por uma diminuição no número de núcleos com grandes cromocentros, mas, o corpúsculo cromatínico sexual não é afetado.

Após analisar outros casos JOHN (1988) conclui que o termo cromatina condensada inclui uma variedade de tipos cromatínicos com diferentes características moleculares e biológicas. Assim, a produção de cromocentros não é em si uma base adequada para definir heterocromatina.

A variação morfológica encontrada no presente trabalho em células de testículo de **A. aegypti** e **A. fluviatilis** pode corresponder a diferentes momentos da intérfase e a diferença encontrada entre as duas espécies pode ser devida a diferenças de estrutura e função da cromatina. Entretanto, a melhor compreensão dessas variações depende de um estudo mais profundo. Tentamos corar o material com banda C, mas as modificações da técnica, já experimentadas, não deram bons resultados.

Nessas células interfásicas coradas com orceína é possível também ver o nucléolo, geralmente único, mas algumas vezes em número de dois, que aparece como um espaço claro, às vezes rodeado pela granulação de cromatina condensada.

No decorrer deste trabalho, à medida em que eram analisadas amostras de *A. aegypti* coletadas em São José do Rio Preto, observava-se um número elevado de indivíduos portadores de vários tipos de anomalias nas células em divisão. Entre essas anomalias havia cromossomos retardatários, pontes anafásicas, quebras, fragmentos cromossômicos, anáfases multipolares e células poliplóides. Nos testículos de 71,43% desses indivíduos, analisados no presente trabalho, havia algum tipo de alteração numa frequência média de 5,15 células portadoras por indivíduo. Nos gânglios cerebrais de 21,43% dos indivíduos analisados e, em uma média de 3,34 células por indivíduo, havia também algum tipo de alteração.

Suspeitamos que essa alta incidência de aberrações pudesse estar relacionada com as pulverizações cíclicas com inseticidas realizadas na Cidade de São José do Rio Preto, naquele período, visando a combater o *A. aegypti* cuja incidência atingia níveis acima dos considerados aceitáveis, paralelamente à constatação de epidemia. Com este fim, a SUCEN de São José do Rio Preto tem utilizado, para pulverização ambiental, inseticidas piretróides cujos princípios ativos são a Deltametrina (nas pulverizações casa a casa, com máquina portátil) e a Cipermetrina (nas pulverizações com equipamento pesado). No ano de 1989 e parte de 1990, neste último tipo de pulverização, foi usado o organofosforado Cition, cujo princípio ativo é o Malation. Em pulverizações localizadas (borracharias, prédios em construção e outros locais de águas



paradas), é usado o organofosforado Folition (cujo princípio ativo também é o Malation). O organofosforado Abate, sob forma granulada (também com o princípio ativo Malation), foi e continua sendo utilizado para controle de larvas e pupas, em vasos de flores e outros recipientes que acumulam água, pois, sua liberação é lenta, chegando a durar três meses. De acordo com o tipo de máquina usada para pulverização com equipamento pesado, o inseticida é dissolvido em óleo de soja ou em óleo diesel.

A suspeita quanto às causas das alterações morfológicas observadas originou do grande número de trabalhos, na literatura, que mostram alta incidência de anomalias da divisão cromossômica relacionada com pesticidas. Por exemplo, o Phosalone é um pesticida organofosforado e seus efeitos genotóxicos foram estudados em tecido meristemático de raiz de *Allium cepa* por SINHA et al. (1989). Diferentes períodos de tratamento usando diferentes concentrações do pesticida mostraram uma diminuição no índice mitótico e um aumento gradual na porcentagem de anomalias cromossômicas, tais como, cromossomos e cromátides fragmentados, estiramento dos cromossomos, cromossomos retardatários, poliploidia e "massas" de cromossomos. Esta relação entre concentração e tempo de tratamento com porcentagem de anomalias já havia sido descrita, antes, por vários autores, trabalhando com alguns pesticidas em plantas (ver, por exemplo, REDDY & RAO, 1969 e KAUR & GROVER, 1985).

Desde o início dos anos 70, compostos organofosforados que são efetivos inibidores da colinesterase em insetos, tornaram-se os inseticidas mais intensamente utilizados. A maioria deles são ésteres ou ésteres amida de ácido fosfórico (WILD, 1975 apud HERATH et al., 1989). Os organofosforados mais comumente usados têm como



princípio ativo o Malation. Ele tem um alto grau de solubilidade em água e uma meia vida curta (BEDFORD & ROBINSON, 1972 apud HERATH et al., 1989).

HERATH et al. (1989) estudaram o potencial do Malation como agente genotóxico, com base em danos nos cromossomos e porcentagem de trocas entre cromátides irmãs (TCI) em cultura de linfócitos humanos. Foram encontradas muitas aberrações, como falhas e quebras, e a porcentagem de trocas entre cromátides irmãs também foi significativamente elevada.

O Malation é convertido, nos mamíferos, por hidrólise, em ácido malatiônico. Este é um inibidor fraco da colinesterase, mas malation e ácido malatiônico são agentes alquilantes de ácidos nucleicos (WILD, 1975 apud HERATH et al., 1989). Existe, portanto, um perigo no uso difundido de Malation, por si próprio ou por seus produtos que podem alterar a composição dos ácidos nucleicos por alquilação. O aumento significativo de aberrações cromossômicas e de TCI, suporta claramente esta conclusão. Malation deve ser visto com precaução, como agente genotóxico potente, particularmente por aqueles que estão em contato com o composto repetidamente (HERATH et al., 1989).

KUMAR & SINHA (1989) pesquisaram os efeitos de 3 inseticidas: o Malation, o Metacid e o Lindane, em raízes de cebola, em 10 concentrações diferentes. Os três inseticidas causaram diminuição do índice mitótico e induziram anormalidades tais como fragmentação, "clumping", poliploidia, alongamentos, células binucleadas, distúrbios de citocinese, pontes anafásicas, cromossomos retardatários e quebras cromossômicas. O padrão de anormalidades aumentou rapidamente com o aumento das concentrações.

ADAM et al. (1990) também estudaram o efeito do Malation e do Taron em raiz de *Vicia faba*. Os resultados também mostraram que, ambos os inseticidas, conduzem a anomalias cromossômicas (pontes, cromossomos retardatários, células binucleadas e outras).

Outros agentes causadores de aberrações dos tipos mencionados, referidos na literatura, são herbicidas e vários outros tipos de drogas, radiação ionizante e até hibridação interespecífica.

RAI (1964) estudou os efeitos do quimioesterilizante Afolate em cromossomos de gânglios cerebrais de larvas de *A. aegypti*. Foram encontradas numerosas aberrações cromossômicas como estiramentos, deficiências, cromossomos em anel, cromossomos dicêntricos, pontes anafásicas e quebras. Esta última apareceu frequentemente na região da constrição secundária em um dos cromossomos maiores. Em algumas células foi observada tetraploidia.

Entre os herbicidas utilizados incluem-se o Garlon-4 e o Tribunil, cujos efeitos foram estudados em raiz de *Allium cepa* (EL-KHODARY et al., 1989, 1990) e o Isoproturon, que é um substituto da uréia, também em raiz de *Allium cepa* (CHAUHAN & SUNDARARAMAN, 1990).

Fertilizantes como sulfato de amônia, fosfato de amônia, nitrato de amônia, cloreto de potássio e sulfato de magnésio são tidos como produtores de quebras cromossômicas e outras anormalidades nas divisões celulares de raiz de *Allium cepa* (ABRAHAM, 1965) e em raiz de *Vicia faba* (ABRAHAM & NAIR, 1989). Os autores sugerem que o uso indiscriminado e excessivo desses fertilizantes pode produzir anormalidades nas células em divisão das raízes das plantas expostas. Esses compostos são utilizados para suprir o solo com os nutrientes essenciais necessários para o



crescimento das plantas.

O efeito de fertilizantes fosfatados foi analisado em camundongos, aos quais foram administradas doses diárias de 500 mg, durante 7 dias (CHAURASIA & SINHA, 1988). Os autores encontraram um aumento de 6 vezes no padrão de anormalidade presentes nas células da medula óssea. Os mesmos resultados foram obtidos para cloreto de potássio administrado, nas mesmas condições, a camundongos (CHAURASIA & SINHA, 1990).

Outras drogas têm sido testadas como por exemplo o Safrole, que é uma substância natural presente em condimentos. Esta substância foi testada por JAIN (1989a) em uma linhagem celular denominada V79. Foram encontradas inúmeras anormalidades como falhas cromatídicas, quebras, fragmentos e cromossomos dicêntricos indicando que o safrole é capaz de alterar o genótipo. Entretanto, segundo o autor, são necessários estudos mais detalhados para conhecer os efeitos de interação e também para identificar os produtos alimentícios nos quais ele está presente e assim, determinar o limite permitido.

JAIN (1989b) testou uma droga sintética antitumor, o ICR-170 (2-metoxi-6-cloro-9-(3 - (etil-2-2 cloro etil) - aminopropil amino) acridina 2HCl) no sistema de linhagem celular V79. Foram encontradas as mesmas anormalidades cromossômicas mencionadas para o safrole como: falhas, quebras, fragmentos sugerindo, segundo o autor, que o ICR-170 é um forte mutagênico, cromotóxico e pode ser carcinogênico.

Os efeitos dos raios gama foram analisados em sementes de **Vigna radiata** (IGNACIMUTHU & SAKTHIVEL, 1989) e de **Solanum** (DAS & ROY, 1989). Foram encontradas aberrações cromossômicas tais como



univalentes, trivalentes, multivalentes, cromossomos não orientados, associações, cromossomos retardatários, pontes e micronúcleos, em várias doses dos tratamentos. O aumento da exposição, aumentava a frequência de aberrações e a esterilidade dos grãos de pólen.

RAI (1963b) estudou os efeitos citogenéticos dos raios X em larvas de *A. aegypti*. Foi encontrada uma diminuição da atividade mitótica nos gânglios cerebrais, além de aberrações como "clumping", estiramentos, pontes anafásicas, deficiências terminais e cromossomos em anel. Foram observados, também, fragmentos cromossômicos acêntricos. Segundo o autor, na anáfase, esses fragmentos ficariam atrasados em relação aos cromossomos cêntricos. No final da divisão mitótica, porém, esses fragmentos não foram observados nos núcleos filhos. Entretanto, foram observados alguns cromossomos com grande desigualdade no tamanho dos braços, indicando que os fragmentos teriam se ligado aos cromossomos cêntricos e assim acompanhado o movimento anafásico.

Constitue um exemplo de hibridação causando alto grau de anormalidade na meiose (triploidia, cromossomos retardatários, distribuição irregular dos cromossomos para os pólos das células) o realizado entre *Solanum americanum* e *S. villosum* ssp *puniceum*, ambas espécies pertencentes ao complexo *S. nigrum* (BEG & KHAN, 1989).

Visando a testar a hipótese de efeitos dos inseticidas, buscamos amostras de *A. aegypti* no criadouro do laboratório da SUCEN de Marília. Nessa cidade não foram realizadas pulverizações em massa. Apenas alguns locais como borracharias, na periferia da cidade, bem longe daquele laboratório, foram pulverizados com máquina portátil. A obtenção do material, desse laboratório, era uma garantia da não ação de inseticidas sobre as amostras.

Nas amostras obtidas em Marília não foram observadas as alterações como encontradas em São José do Rio Preto. Nenhuma aberração foi encontrada nos gânglios cerebrais e, nos testículos, apenas um indivíduo (1,96%), das amostras analisadas, apresentou duas células com falhas ou quebras. Nas gônadas larvais três indivíduos (12%) apresentaram cromossomos retardatários.

Concluimos que os resultados obtidos nas amostras de São José do Rio Preto, podem ser decorrentes dos efeitos genéticos dos inseticidas empregados nesta cidade. Esses inseticidas matam os adultos em proporções elevadas (já há alguma indicação de resistência) e nas águas paradas atuam sobre os ovos, larvas e pupas em desenvolvimento, provavelmente causando alto grau de esterilidade nos adultos originados a partir deles, contribuindo também para o controle.

Os resultados de *A. fluviatilis* corroboram a conclusão de que as aberrações observadas são efeito dos inseticidas utilizados para controle do *Aedes*. Nenhuma alteração foi encontrada nos gânglios cerebrais dessa espécie, mas, nos testículos, 43,40% dos indivíduos analisados apresentaram uma média de 6,30 células afetadas por algum tipo de alteração. Araraquara sofreu pulverizações que, segundo o biólogo responsável pelo criadouro da SUCEN daquela cidade (onde foram obtidas as amostras), afetaram a mortalidade dos mosquitos, elevando-a naquele laboratório.

Outro efeito que pode ser atribuído aos inseticidas é o número significativamente menor de células em divisão encontrados nos testículos de *A. aegypti* de São José do Rio Preto e *A. fluviatilis* quando comparados com *A. aegypti* de Marília.



O grande número de células em divisão observado nas gônadas larvais, de *A. aegypti* de Marília quando comparado com o testículo da mesma espécie e procedência deve ser decorrente do estágio do desenvolvimento. Na larva, estágio em que as gônadas foram obtidas, a atividade de divisão celular deve ser mais intensa do que na pupa, em que foram obtidos os testículos.

Diferentemente do observado por RAI (1963b), utilizando raios X, não foi encontrada diferença significativa no número de células em divisão do cérebro, na comparação das três populações realizada neste trabalho. Contudo, há diferença numérica favorecendo Marília, em comparação com as outras duas populações.

Entre as aberrações encontradas em *Aedes*, no presente trabalho, a poliploidia foi anteriormente descrita por RISLER (1959 apud BHALLA, 1971) na epiderme de larvas de *A. aegypti* e referida como "complexos cromossômicos múltiplos" e BHALLA (1971) relatou a ocorrência de tetraploidia em testículo de pupa de um indivíduo originado de um estoque de laboratório portador de inversão.

Um caso de trissomia para o cromossomo 3 também foi descrito em testículo de uma pupa de *A. aegypti*, obtida de um estoque diplóide de laboratório, por VED BRAT & RAI (1975). O cromossomo extra aparecia como um univalente ou envolvido em um trivalente. Um caso de trissomia do cromossomo 1, devido ao efeito de radiação no sistema meiótico foi anteriormente encontrado em uma pupa macho por RAI (1968 apud VED BRAT & RAI, 1975).

Esses casos descritos na literatura são casos esporádicos, encontrados em baixa frequência. No presente trabalho, entretanto, a frequência de indivíduos portadores de células poliplóides e a frequência destas, em cada indivíduo, foram elevadas em *A. aegypti*



de São José do Rio Preto e principalmente em *A. fluviatilis*.

A ocorrência de poliploidia entre os animais é menos frequente que entre os vegetais, pois, na reprodução sexuada, a poliploidia determina a formação de gametas cromossômicamente anormais levando a um alto grau de esterilidade (ver, por exemplo, WHITE, 1973).

As falhas frequentemente encontradas em um dos cromossomos meióticos pareados de *A. aegypti* de São José do Rio Preto e *A. fluviatilis* apresentam-se localizadas em um dos braços em sua região intermediária ou mais próximo do centrômero. A região das falhas parece comportar-se como um sítio frágil propenso a quebras, de modo que, em alguns casos, a observação de quebras ou extremidades heteromórficas poderia ser atribuída à perda de pedaços quebrados nessas regiões. Podemos lembrar os resultados já citados de RAI (1964) que encontrou quebras frequentes na região de constrição secundária em um dos cromossomos maiores, sob o efeito do Afolate.

Em *Aedes atropalpus*, RAI (1963a) descreveu a presença de uma quebra acromática em um ou ambos os homólogos, no braço mais curto do cromossomo 3, em direção à extremidade distal. Segundo o autor, essa quebra não aparecia em *A. aegypti*. A falha acromática ou uma descontinuidade não corada, de acordo com o autor, aparecia como uma constrição secundária. Algumas vezes as extremidades dos cromossomos homólogos, neste ponto, ficavam separadas, dando a aparência de um quarto cromossomo extra. O fato de que muito frequentemente a falha não corada estava presente em somente um dos homólogos podia, segundo o autor, indicar que não é uma constrição secundária. Ambos os tipos foram notados na mesma larva. Durante a anáfase este cromossomo tendia a se curvar neste ponto fraco.

Segundo WHITE (1973) existe uma dificuldade considerável em contar o número de quebras vistas na metáfase em material experimental, e diferentes pesquisadores observaram resultados discrepantes, embora trabalhando com o mesmo organismo. A dificuldade parece ser resultado de uma confusão entre quebras cromatídicas verdadeiras e falhas ou lesões não coradas, produzidas por irradiação, as quais são similares, na aparência, às constrições secundárias que ocorrem naturalmente. A natureza daquelas lesões tem originado muita controvérsia. Elas não são quebras completas no sentido de interrupção da continuidade do cromossomo, embora sejam certamente locais mecanicamente fracos, onde os cromossomos podem quebrar caso sejam esticados (EVANS, 1961 apud WHITE, 1973). Alguns autores têm interpretado essas falhas acromáticas como quebras subcromáticas. Entretanto, EVANS (1962 apud WHITE, 1973) colocou que esta explicação estaria correta caso fosse observado um grande número de quebras cromatídicas na "segunda mitose após a irradiação", o que não ocorre. É possível que essas falhas sejam um grupo heterogêneo de aberrações originadas por várias causas. Foi sugerido que seriam devidas a desespiralização localizada do DNA, mas, o mecanismo de desespiralização é desconhecido e não está claro se falhas envolvem mutações no sítio das alterações observadas. Falhas cromatídicas podem ser produzidas por irradiação no fim da intérfase ou na prófase. Em algumas espécies de animais "constrições elásticas" que se tornam enormemente esticadas no fuso anafásico, foram ocasionalmente observadas em material coletado de populações naturais.

Quanto ao uso da técnica de coloração pelo nitrato de prata, específica para regiões organizadoras nucleolares (RONs) e



nucléolos, os resultados mostraram que acontece com *Aedes* o mesmo que ocorre com outros insetos, como a *Drosophila* (BICUDO, 1982), isto é, não há marcação diferencial das regiões organizadoras nucleolares e, além do nucléolo, apenas os centrômeros coram-se diferencialmente, em algumas lâminas. A marcação diferencial dos centrômeros com a prata, foi também observada, em outros insetos como os acridídeos *Ommalotetti obliquus* e *Osmilia violacea* (CELLA, 1987).

No caso de *Aedes*, a coloração diferencial dos nucléolos ocorreu somente nas células do testículo, em intérfase. Nas células em prófase I, quando os cromossomos começam a se individualizar, o nucléolo perde a capacidade de coloração diferencial. Sabe-se que o nitrato de prata cora proteínas acídicas que se associam ao DNA e RNA ribossômicos, tais como RNA polimerase 1, B₂₃ e C₂₃ (PLOTON *et al.*, 1986, 1988). Assim, a perda da capacidade de coloração diferencial pode refletir a perda desses componentes na sequência de eventos que levam ao desaparecimento do nucléolo no final da prófase.

Também foi observada uma variação no padrão das regiões coradas com nitrato de prata, nos diferentes órgãos analisados e mesmo em células diferentes de um mesmo órgão. Em todos os casos predominou uma marcação única, embora em alguns casos, aparecessem duas e às vezes, aparentemente, três. Nem sempre foi observada uma relação direta entre tamanho do núcleo e tamanho do nucléolo; é o caso das células dos gânglios cerebrais. Nos túbulos de Malpighi, a coloração pelo nitrato de prata, contornando uma região clara lembra o padrão descrito no mesmo órgão de *Triatoma*. Neste organismo o material nucleolar contorna uma massa central heterocromática

V. RESUMO

No presente trabalho foram analisadas preparações citológicas de larvas e pupas de *Aedes aegypti* procedente de São José do Rio Preto e Marília (SP) e de *Aedes fluviatilis* procedente de Araraquara (SP). Os órgãos utilizados para essas preparações foram gânglios cerebrais de larvas de 4^o estágio e testículos de pupa. De *A. aegypti* de Marília foram analisados, também, gônadas e túbulos de Malpighi de larvas de 4^o estágio.

Nas preparações citológicas foi empregada a técnica de esmagamento seguida de coloração com orceína lacto-acética ou nitrato de prata. A coloração com nitrato de prata foi aplicada a lâminas de gânglios cerebrais, túbulos de Malpighi e testículos de *A. aegypti* de Marília. Com exceção de túbulos de Malpighi, todos os demais órgãos das três populações foram corados com orceína lacto-acética.

Observou-se que as duas espécies apresentam cariótipo constituído de três pares de cromossomos sendo dois metacêntricos e um levemente submetacêntrico. Ao que nos consta, esta é a primeira descrição cromossômica de *A. fluviatilis*.

Os resultados obtidos permitem destacar:

- 1- um íntimo pareamento somático entre os cromossomos homólogos mitóticos, às vezes até com ligação centromérica.
- 2- a existência de leptóteno e zigóteno na prófase I da meiose, questionada em *A. aegypti* por alguns autores, os quais alegam que os cromossomos retêm o íntimo pareamento de anáfases e telófases mitóticas anteriores;

- 3- a presença de faixas transversais ligando as cromátides irmãs, na mitose e na meiose I, gerando uma diferenciação semelhante a bandas;
- 4- a não observação de prometáfases alongadas, descritas por vários autores em algumas espécies de *Aedes*, incluindo *A. aegypti*, e nem de cromossomos "pegajosos" levando frequentemente à formação de uma massa cromática única na metáfase e anáfase I;
- 5- a existência de padrões diferentes quanto à granulação de cromatina (cromocentros), nas células interfásicas do testículo, entre *A. aegypti* e *A. fluviatilis* e entre diferentes células desse órgão, numa mesma espécie. O padrão constituído de um único cromocentro grande e periférico foi observado exclusivamente em *A. fluviatilis*. Outros padrões constituídos de um número variável de cromocentros e granulação fina foram observados nas duas espécies;
- 6- nas amostras de *A. aegypti*, coletadas em São José do Rio Preto, observou-se um número elevado de indivíduos portadores de vários tipos de anomalias nas células em divisão, incluindo quebras, falhas, cromossomos retardatários, pontes anafásicas, fragmentos cromossômicos, anáfases multipolares e células poliplóides. Para testar a hipótese de que estas alterações poderiam ser atribuídas à utilização de inseticidas, pela SUCEN, para controle do *Aedes*, foram também analisadas amostras obtidas no laboratório da SUCEN de Marília, cidade em que não houve o controle utilizado em São José do Rio Preto. Enquanto 71,43% dos indivíduos de *A. aegypti* de São José do Rio Preto apresentaram algum tipo de alteração, nos testículos, numa frequência média de 5,15 células afetadas, por indivíduo, e 21,42% dos indivíduos



apresentaram uma média de 3,34 células portadoras de anomalias nos gânglios cerebrais, em *A. aegypti* de Marília 1,96% dos indivíduos apresentaram células com cromossomos retardatários nos testículos e nenhum apresentou alterações nos gânglios cerebrais. Esses resultados suportam a hipótese de efeito dos inseticidas;

7- em *A. fluviatilis* nenhuma anomalia foi encontrada nos gânglios cerebrais, mas, nos testículos, 43,40% dos indivíduos analisados apresentaram uma média de 6,30 células com algum tipo de alteração. Esses resultados reforçam a hipótese de efeito dos inseticidas, pois, em Araraquara, houve também intensa utilização dos mesmos para controle de *Aedes*;

8- o número de células em divisão foi significativamente menor nos testículos de *A. aegypti* de São José do Rio Preto e de *A. fluviatilis* do que nos testículos de *A. aegypti* de Marília. Este resultado é mais um reforço para a hipótese do efeito dos inseticidas, pois, já se sabe, pelos resultados da literatura que alguns deles, como é o caso do Malation, determinam uma redução do índice mitótico. Não foi, porém, encontrada diferença significativa, entre as três populações, quanto ao número de células em divisão nos gânglios cerebrais;

9- em *A. aegypti* de Marília, o número de células em divisão nas gônadas larvais foi maior do que nos testículos de pupa, fato que deve ser decorrente de uma atividade mitótica mais intensa na fase de larva do que na de pupa;

10- o nitrato de prata aplicado às preparações de testículo corou diferencialmente o nucléolo, nas células em intérfase. Nas células em prófase I porém, aquele organóide parece perder a

- capacidade de coloração diferencial. Atribuimos essa observação à possível perda dos componentes argentofílicos do nucléolo, na sequência de eventos que levam ao seu desaparecimento no final da prófase;
- 11- diferentes células de um mesmo órgão e os diferentes órgãos analisados mostraram variação quanto ao tamanho e ao aspecto dos nucléolos. Em todos os casos predominou um único corpúsculo nucleolar;
- 12- não houve marcação diferencial das regiões organizadoras nucleolares nos cromossomos de *A. aegypti*. Esse comportamento é o mesmo observado para outros insetos, como *Drosophila*. Também, como em *Drosophila*, algumas lâminas mostraram coloração diferenciada das regiões cromossômicas centroméricas, sugerindo a presença de componentes argentofílicos na heterocromatina constitutiva que forma aquelas regiões.



VI. SUMMARY

Mitotic and meiotic cells of *Aedes aegypti* from São José do Rio Preto and Marília (SP) and *Aedes fluviatilis* from Araraquara (SP) were studied. Squash preparations of 4rth instar larva brain, Malpighian tubes and gonads and of pupa testes were stained with lacto-acetic orcein or silver nitrate.

The karyotype of both species is characterized by the presence of three chromosome pairs, two metacentric and one slightly submetacentric. This is apparently the first description of *A. fluviatilis* karyotype. Other results were:

- 1- a high degree of synapsis between homologous chromosomes in mitosis, sometimes showing centromeric association.
- 2- the existence of leptonema and zygonema stages in both species. Some authors deny the presence of these stages in meiosis of *A. aegypti*, affirming that the chromosomes retain the intimate pairing of anterior mitotic anaphases and telophases;
- 3- the presence of transverse differentiation appearing as bands along the sister chromatids, binding them together, both in mitosis and meiosis;
- 4- the fact that stretched prometaphase chromosomes and sticky chromosomes were not found in *A. aegypti* or *A. fluviatilis*. Some authors have considered those features characteristic of *A. aegypti* and other *Aedes* species;
- 5- the finding of pattern differentiation, between the species studied, as to the chromocenters in interphase nuclei of testes. The presence of a single, large peripheral chromocenter was observed only in *A. fluviatilis*. Patterns involving

- chromocenters, variable in number and size, were observed in cells of both species;
- 6- *A. aegypti* from São José do Rio Preto showed a high frequency of individuals bearing different kinds of anomalies in the dividing cells, including breaks, gaps, lagging chromosomes, anaphase bridges, chromosome fragments, tripolar anaphases and polyploidy. In order to test the hypothesis that such anomalies resulted from the effect of insecticides used for *Aedes* control in São José do Rio Preto, samples of *A. aegypti* from Marília, not submitted to the same control, were analyzed. While in São José do Rio Preto, 71.43% of the mosquitoes showed some kind of cell anomaly, in the testes, with a mean of 5.15 affected cells per individual, and 21.42% of individuals showed a mean of 3.34 cells bearing anomalies in brains, in Marília only 1.96% of individuals showed a few cells with lagging chromosomes in the testes and none in the brain;
- 7- in *A. fluviatilis* no anomaly was found in brain, but 43.40% of the individuals showed a mean of 6.30 cells bearing some kind of change in testes;
- 8- the number of dividing cells was significantly smaller in testes of *A. aegypti* from São José do Rio Preto and *A. fluviatilis* than in *A. aegypti* from Marília. Data in literature show that insecticides such as Malathion (used for *Aedes* control in São José do Rio Preto) cause mitotic index decrease. Thus, the results described in items 6, 7 and 8 support the hypothesis that the aberrations detected are due to insecticides present in the environment;



- 9- in *A. aegypti* from Marília the number of dividing cells was significantly greater in larval gonads than in pupal testes, probably due to a greater mitotic activity in larvae than in pupae;
- 10- silver nitrate used in testes preparations stained nucleoli in interphase cells but not in zygonema stage. Apparently nucleoli of cells in mid prophase lose their capacity of differential staining. We believe that, at this time, nucleoli argyrophilic components are lost in the sequence of events which lead to nucleoli desintegration at the end of prophase;
- 11- besides the testes, Malpighian tubes and brains of *Aedes* were also Ag-stained. Different cells in the same organ or different organs showed variation as to the size and aspect of nucleoli. In every case cells bearing a single nucleolus predominated;
- 12- as also observed in other insects such as *Drosophila*, nucleolar organizing regions of *A. aegypti* did not stain with silver nitrate. However, as also happens sometimes with *Drosophila*, chromosome centromeric regions showed differential staining in some preparations denoting the probable presence of argyrophilic components in the constitutive heterochromatin of those regions.

SHALLA, S.C. - Genetic behavior of *Aedes* and *Aedes* *aegypti*. *Genética* (São Paulo), 31(7): 397-404, 1971.

PICUCCI, H.E.H. de C. - Estudos citogenéticos de *Aedes* *aegypti* no Complexo Múltiplo (Cromossomos). *Revista de Genética* (São Paulo), 19(1): 1-10, 1972.



VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, S. - Studies on spontaneous and induced mutations in plants. *Cytologia*, **30**: 155-172, 1965.
- ABRAHAM, S. & NAIR, R.B. - Production of mitotic abnormalities by magnesium sulphate in *Vicia faba* L. *Cytologia*, **54**: 559-563, 1989.
- ADAM, Z.M.; EBAD, F.A.; ABO-EL-KHEIR, Z.A.; EL-SHEIKH, I.A. - Alterations in nucleic acids, protein content and mitotic division of *Vicia faba* root tip cells as affected by malathion and tamaron insecticides. *Cytologia*, **55**(3): 349-355, 1990.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. de - Estudo citogenético em túbulos de Malpighi, glândulas salivares e testículos de triatomíneos (Triatominae, Heteroptera). 247p. São José do Rio Preto (s.c.p.) 1990. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP, 1990.
- BABU, C.J.; PANICKER, K.N. & DAS, P.K. - Breeding of *Aedes aegypti* in closed septic tanks. *Indian J. Med. Res.*, **77**: 637, 1983.
- BEG, M.Z. & KHAN, A.H. - Crossability and genomic relationship of some species of *Solanum nigrum* complex. *Cytologia*, **54**(1): 21-26, 1989.
- BHALLA, S.C. - Meiotic behavior of diploid and tetraploid *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, **31**(3): 397-401, 1971.
- BICUDO, H.E.M. de C. - Estudos citogenéticos de espécies de *Drosophila* do Complexo Mulleri (Grupo Repleta). A regulação da atividade organizadora nucleolar. Série monografias, teses e dissertações, **1**, IBILCE - UNESP, 1982. 208p.



- BICUDO, H.E.M. de C.; MADI-RAVAZZI, L.; NANYA, S. - Simplified Ag-staining technique for nucleolar organizing regions and nucleoli. **R. bras. Genet.** (Technical note) (Inédito).
- BOQUIST, L.L.V. - Nucleolar organizer regions in normal, hiperplastic and neoplastic parathyroid glands. **Virchows Archiv. A Pathol. Anat.**, 417: 237-241, 1990.
- BRELAND, O.P.; GASSNER III, G.; RIEMANN, J.G. - Studies of meiosis in the male of the mosquito *Culiseta inornata*. **Ann. Entomol. Soc. America**, 57: 472-479, 1964.
- CAMARGO, M.V.T.; CONSOLI, R.A.G.B.; WILLIAMS, P.; KRETTLI, A.V. - Factors influencing the development of *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes fluviatilis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 78: 83-94, 1983.
- CELLA, D.M. - Estudos cromossômicos através do uso de técnicas de coloração diferencial em espécies da família Acrididae (Orthoptera, Caelifera, Ommatolampinae, Cyrtacanthacridinae, Melanoplinae). 201p. Rio Claro, 1987. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, UNESP, 1987.
- CHAUHAN, L.K.S. & SUNDARARAMAN, V. - Effect of substituted ureas on plant cells I. Cytological effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Cytologia**, 55(1): 91-98, 1990.
- CHAURASIA, O.P. & SINHA, S.P. - Induction of mitotic chromosome anomalies in mice by single super phosphate. **Cytologia**, 53(3): 485-489, 1988.
- CHAURASIA, O.P. & SINHA, S.P. - Induction of mitotic chromosome anomalies in mice by muriate of potash. **Cytologia**, 55(1): 87-90, 1990.
- CRAIG, G.B.Jr. & HICKEY, W.A. - Genetics of *Aedes aegypti*. In: WRIGHT, J.W. & PAL, R. Eds. - Genetic of insect vectors of



- disease. New York: Elsevier Publishing Company, 1967. p.67-131.
- DAS, S.K. & ROY, S.K. - Radiocytogenetical studies on *Solanum* L. Meiotic abnormalities. *Cytologia*, 54(3): 477-481, 1989.
- DEMEREK, M. & KAUFMANN, B.P. - *Drosophila* guide. Baltimore: Baltimore Press, 1945.
- DEV, V. & RAI, K.S. - Genetics of speciation in the *Aedes* (*Stegomyia*) *scutellaris* group (Diptera: Culicidae). V. Chromosomal relationships among five species. *Genetica*, 64: 83-92, 1984.
- DEV, V. & RAI, K.S. - Genetic relationships among certain species of the *Aedes* (*Stegomyia*) *scutellaris* group (Diptera: Culicidae). *Ann. trop. Med. Parasitol.*, 79(3): 325-331, 1985.
- DOBZHANSKY, T. - Isolamento reprodutivo. In: _____. *Genética do processo evolutivo*. São Paulo: EDUSP-POLIGONO, 1973. p. 277-312.
- EL-KHODARY, S.; HABIB, A.; HALIEM, A. - Cytological effect of the herbicide Garlon-4 on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia*, 54(3): 465-472, 1989.
- EL-KHODARY, S.; HABIB, A.; HALIEM, A. - Effects of the herbicide Tribunil on root mitosis of *Allium cepa*. *Cytologia*, 55(2): 209-215, 1990.
- FORATTINI, O.P. - Gêneros *Aedes* e *Psorophora*. In: _____. *Entomologia médica*. São Paulo: EDUSP, 1965. v. 2, p.229-496.
- FORATTINI, O.P. - Identificação de *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) no Brasil. *R. Saúde públ.*, 20(3): 244-245, 1986.
- FOX, I. - Malathion resistance in *Aedes aegypti* of Puerto Rico induced by selection pressure on larvae. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 29(6): 1456-1459, 1980.

- FRANCO, O. - História da febre amarela no Brasil. *R. bras. Malariol. e Doenças trop.*, 21(2): 315-512, 1969.
- FREIER, J.E. & BEIER, J.C. - Oral and transovarial transmission of La Crosse virus by *Aedes atropalpus*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 33(4): 708-714, 1984.
- HARRINGTON, M.A.; HACKER, C.S.; CHENG, K.L.; FERREL, R.E. - Genetic variation in an urban population of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. med. Entomol.*, 21(6): 706-710, 1984.
- HARTBERG, W.K. & CRAIG, G.B.Jr. - Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes. I. Sexual isolation between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. *Ann. Entomol. Soc. America*, 61(4): 865-870, 1968.
- HARTBERG, W.K. & CRAIG, G.B.Jr. - Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes. II. Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. *Evolution*, 24: 692-703, 1970.
- HARTBERG, W.K.; CULP, R.; KERR, M.; MORGAN, J.; ODOM, C. - Mitotic chromosomes of the mosquito *Aedes* (*Gymnometopa*) *mediovittatus* (Coquillett). *Mosquito Systemat.*, 17(1): 44-48, 1985.
- HAWLEY, W.A.; REITER, P.; COPELAND, R.S.; PUMPUNI, C.B.; CRAIG, G.B. Jr. - *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from Northern Asia. *Science*, 236: 1114-1115, 1987.
- HERATH, J.F.; JALAL, S.M.; EBERTZ, K.J.; MARTSOLF, J.T. - Genotoxicity of the organophosphorus insecticide Malathion based on Human Lymphocytes in culture. *Cytologia*, 54: 191-195, 1989.
- HOWELL, W.M. & BLACK, D.A. - Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: 1 - step method. *Experientia*, 36: 1014-1015, 1980.



- HULL, B.; TIKASINGH, E.; SOUZA, M.; MARTINEZ, R. - Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 33(6): 1248-1250, 1984.
- IGNACIMUTHU, S. & SAKTHIVEL, N. - Induced chromosomal abnormality and pollen sterility in *Vigna radiata* (L) Wilczek cv. PS 16. *Cytologia*, 54(1): 109-114, 1989.
- JAIN, A.K. - 6-Thioguanine (6TG) resistant mutation, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCE's) in V79 cells. I. Induced by Safrole. *Cytologia*, 54(1): 145-148, 1989a.
- JAIN, A.K. - 6-Thioguanine (6TG) resistant mutation, chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCE's) in V79 cells. II. Induced by ICR-170. *Cytologia*, 54(1): 149-152, 1989b.
- JOHN, B. - The biology of heterochromatin. IN: VERMA, R.S. (Ed.). *Heterochromatin: molecular and structural aspects*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. p.1-128.
- JONES, J.C. - The feeding behaviour of mosquitoes. *Scient. Am.*, 238(6): 112-120, 1978.
- JOST, E. - Meiosis in the male *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* and fertilization in the *Culex pipiens*-complex. *Can. J. Genet. Cytol.*, 13: 237-250, 1971.
- KAUR, P. & GROVER, J.S. - Cytological effects of some organophosphorus pesticides. I. Mitotic effects. *Cytologia*, 50: 187-197, 1985.
- KHAWALED, K.; BARAK, Z.; ZARITSKY, A. - Feeding behaviour of *Aedes aegypti* larvae and toxicity of dispersed and of naturally encapsulated *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *J. Invert. Pathol.*, 52: 419-426, 1988.

- KITZMILLER, J.B. - Mosquito genetics and cytogenetics. *R. bras. Malariol. e Doenças trop.*, 5: 285-359, 1953.
- KUMAR, D. & SINHA, S.P. - Threshold dose of cytogenetic toxicity of Lindane, Malathion and Metacid in *Allium cepa* root-tip cells *Cytologia*, 55(3): 547-552, 1989.
- LIMA, J.T.F. - Risco de urbanização da febre amarela no Brasil. *Cad. Saúde públ.*, 1(3): 377-384, 1985.
- LUSTOSA, E.S.; SILVA, I.G.; CARVALHO, M.E.D.; NAVES, H.A.M.; CAMPOS, E.S. - Ocorrência de *Aedes (Finlaya) fluviatilis* (Lutz, 1904) (Diptera: Culicidae) em Goiânia. *An. Soc. Entomol. Brasil*, 18(1): 191-192, 1989.
- MARCHI, A. & RAI, K.S. - Chromosome banding homologies in three species of *Aedes (Stegomyia)*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 28: 198-202, 1986.
- MARINOTTI, O.; JAMES, A.A. & RIBEIRO, J.M.C. - Diet and salivation in female *Aedes aegypti* mosquitoes. *J. Insect Physiol.*, 36(8): 545-548, 1990.
- MCDONALD, P.T. & RAI, K.S. - Correlation of linkage groups with chromosomes in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Genetics*, 66: 475-485, 1970.
- MESCHER, A.L. & RAI, K.S. - Spermatogenesis in *Aedes aegypti*. *Mosquito News*, 26(1): 45-51, 1966.
- METSELAAR, D.; GRAINGER, C.R.; OEI, K.G.; REYNOLDS, D.G.; PUDNEY, M.; LEAKE, C.J.; TUKEI, P.M.; D'OFFAY, R.M.; SIMPSON, D.I.H. - An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 58(6): 937-943, 1980.

- MICKS, D.W. & MOON, W.B. - *Aedes aegypti* in a Texas coastal county as an index of dengue fever receptivity and control. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 29(6): 1382-1388, 1980.
- MILLER, B.R. & BALLINGER, M.E. - *Aedes albopictus* mosquitoes introduced into Brazil: vector competence for yellow fever and dengue viruses. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.*, 82: 476-477, 1988.
- MONATH, T.P. - *Aedes albopictus*, an exotic mosquito vector in the United States. *Ann. internal Med.*, 105(3): 449-451, 1986.
- MOORE, C.G.; CLINE, B.L.; RUIZ-TIBÉN, E.; LEE, D.; ROMNEY-JOSEPH, H.; RIVERA-CORREA, E. - *Aedes aegypti* in Puerto Rico: environmental determinants of larval abundance and relation to dengue virus transmission. *The Am. J. trop. Med. Hyg.*, 27(6): 1225-1231, 1978.
- MOORE, C.G.; FRANCY, D.B.; ELIASON, D.A.; MONATH, T.P. - *Aedes albopictus* in the United States: rapid spread of a potential disease vector. *J. Am. Mosquito Control Assoc.*, 4(3): 356-361, 1988.
- MOTARA, M.A. & RAI, K.S. - Chromosomal differentiation in two species of *Aedes* and their hybrids revealed by Giemsa C-banding. *Chromosoma*, 64: 125-132, 1977.
- MOTARA, M.A. & RAI, K.S. - Giemsa C-banding patterns in *Aedes* (*Stegomyia*) mosquitoes. *Chromosoma*, 70: 51-58, 1978.
- MUKHERJEE, A.B. & REES, D.M. - Spermatogenesis in the mosquito *Aedes dorsalis* (Meigen). *Cytologia*, 35(2): 213-219, 1970.
- NENG, W.; SHUSEN, W.; GUANGXIN, H.; RONGMAN, X.; GUANGKUN, T.; CHEN, Q. - Control of *Aedes aegypti* larvae in household water containers by chinese cat fish. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 65(4):

- 503-506, 1987.
- NEWTON, M.E.; SOUTHERN, D.I.; WOOD, R.J. - X and Y chromosomes of *Aedes aegypti* (L.) distinguished by Giemsa C-banding. *Chromosoma*, **49**: 41-49, 1974.
- OSANAI, C.H.; ROSA, A.P.A.T.; TANG, A.T.; AMARAL, R.S.; PASSOS, A.D. C.; TAUIL, P.L. - Surto de dengue em Boa Vista, Roraima. *R. Inst. Med. trop.*, **25**(1): 53-54, 1983. (Nota Prévia).
- PANICKER, K.N.; BAI, M.G.; KALYANASUNDARAM, M. - Well breeding behaviour of *Aedes aegypti*. *Indian J. Med. Res.*, **76**: 689-691, 1982.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGION, F.; ADNET, J.J. - Improvement in the staining and visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.*, **18**: 5-14, 1986.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; LECHKI, C.; JEANNESSON, P.; VISSEAU, B.; ADNET, J.J. - Coloration des organisateurs nucléolaires (NORs) par l'argent. Application à l'étude de la structure du nucléole et intérêts en pathologie. *Ann. Pathol.*, **8**(3): 248-252, 1988.
- POWELL, J.R. & TABACHNICK, W.J. - Genetics and the origin of a vector population: *Aedes aegypti*, a case study. *Science*, **208**(4450): 1385-1387, 1980.
- RAI, K.S. - A comparative study of mosquito karyotypes. *Ann. Entomol. Soc. America*, **56**: 160-170, 1963a.
- RAI, K.S. - A cytogenetic study of the effects of X-irradiation on *Aedes aegypti*. *Caryologia*, **16**(3): 595-607, 1963b.
- RAI, K.S. - Cytogenetic effects of chemosterilants in mosquitoes. I. Apholate induced aberrations in the somatic chromosomes of *Aedes aegypti* L.. *Cytologia*, **29**: 346-353, 1964.

- REDDY, M.V. & RAO, B.V.R. - The cytological effects of insecticides (Dimecron-100 and Rogor-40) on *Vicia faba* L. *Cytologia*, 34(3): 408-417, 1969.
- REYES-VILLANUEVA, F. - El-dengue. Bionomía del vector, transmisión y opciones para su control en México. *Ciencia*, 41: 45-55, 1990.
- ROSEN, L. - Further observations on the mechanism of vertical transmission of flaviviruses by *Aedes* mosquitoes. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 39(1): 123-126, 1988.
- ROSEN, L.; SHROYER, D.A.; TESH, R.B.; FREIER, J.E.; LIEN, J.C. - Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 32: 1108-1119, 1983.
- SHERRON, D.A. & RAI, K.S. - Genetics of speciation in the *Aedes* (*Stegomyia*) *scutellaris* group (Diptera: Culicidae). 3. The genetic relationship of *Aedes cooki* with *Aedes kesseli*. *J. Med. Entomol.*, 21(5): 540-547, 1984a.
- SHERRON, D.A. & RAI, K.S. - Genetics of speciation in the *Aedes* (*Stegomyia*) *scutellaris* subgroup (Diptera: Culicidae). 4. Chromosomal relationships of *Aedes cooki* with four sibling species. *Can. J. Genet. Cytol.*, 26(3): 237-248, 1984b.
- SINHA, R.K.; CHOUDHURY, R.; MALLICK, R. - Cytological effects of Phosalone on root meristem of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 54: 429-435, 1989.
- SLOSEK, J. - *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. *Soc. Sci. Med.*, 23(3): 249-257, 1986.
- SKITH, R.P. & HARTBERG, W.K. - Spermatogenesis in *Aedes albopictus* (Skuse). *Mosquito News*, 34(1): 42-47, 1974.



- SOEKIMAN, S.; MATSUMURA, T.; YAMANISHI, H. - Multiplication of Chikungunya virus in salivary glands of *Aedes albopictus* (DAHU strain) mosquitoes: an electron microscopic study. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, **39**: 207-211, 1986.
- SOPER, F.L.; PENNA, H.A.; CARDOSO, E.; SERAFIN Jr., J.; FROBISHER Jr., M.; PINHEIRO, J. - Yellow fever without *Aedes aegypti*: study of rural epidemic in Vale do Chanaan, Espírito Santo, Brazil. *Amer. Jour. Hyg.*, **18**: 555-587, 1933.
- SUBRA, R. & MOUCHET, J. - The regulation of preimaginal populations of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) on the Kenya coast. II. Food as a main regulatory factor. *Ann. trop. Med. Parasitol.*, **78**(1): 63-70, 1984.
- SUCAN - Superintendência de Campanhas de Saúde Pública - Ministério da Saúde. *Resumo dos principais caracteres morfológicos diferenciais do Aedes aegypti e do Aedes albopictus*. Brasília, 1989. 21p.
- TABACHNICK, W.J. - Geographic and temporal patterns of genetic variation of *Aedes aegypti* in New Orleans. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, **31**(4): 849-853, 1982.
- TABACHNICK, W.J.; MUNSTERMANN, L.E.; POWELL, J.R. - Genetic distinctness of sympatric forms of *Aedes aegypti* in East Africa. *Evolution*, **33**(1): 287-295, 1979.
- TABACHNICK, W.J. & POWELL, J.R. - A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genet. Res.*, **34**: 215-229, 1979.
- TABACHNICK, W.J.; WALLIS, G.P.; AITKEN, T.H.G.; KILLER, B.R.; AMATO, G.D.; LORENZ, L.; POWELL, J.R.; BEATY, B.J. - Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and

- genetic considerations. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 34(6): 1219-1224, 1985.
- TAUIL, P.L. - Carta ao Editor. *R. Soc. bras. Med. trop.*, 20: 133, 1987.
- TAUIL, P.L. - O problema do *Aedes aegypti* no Brasil. *R. Soc. bras. Med. trop.*, 19(1): 1-3, 1986.
- TAYLOR, D.B. - Genetic compatibility of *Aedes* (Protomacleana) triseriatus with *A.* (P.) brelandi and *A.* (P.) hendersoni (Diptera: Culicidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 80(2): 109-117, 1987.
- THOMAS, H.D. - Preliminary studies on the physiology of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). I - The hatching of the eggs under sterile conditions. *J. Parasit.*, 29: 324-327, 1943.
- VANDEHEY, R.C.; BOOTH, K.S.; LEAHY, Sister M.G. - Genetics of *Aedes aegypti* oviposition. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 72: 509-513, 1979.
- VANDERLEY, D.M.V.; GUTIERREZ, E.B.; ANDRADE, J.C.R.; SOUZA, L.T.M.; TENORIO, R.M.P.; MELAMED, E.; KATZ, G.; CORTÁS, M.C.; SILVA, M.V.; MOURA, L.C. - Manual de vigilância epidemiológica. Dengue. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 1987. 23p.
- VED BRAT, S. & RAI, K.S. - Trisomy in *Aedes aegypti*. *Can. J. Genet. Cytol.*, 17: 279-280, 1975.
- WALLIS, G.P.; TABACHNICK, W.J.; POWELL, J.R. - Macrogeographic genetic variation in a human commensal: *Aedes aegypti*, the yellow fever mosquito. *Genet. Res.*, 41: 241-258, 1983.
- WALLIS, G.P.; TABACHNICK, W.J.; POWELL, J.R. - Genetic heterogeneity among Caribbean populations of *Aedes aegypti*. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 33(3): 492-498, 1984.

- WESSON, D.M. - Susceptibility to organophosphate insecticides in larval *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosquito Control Assoc.*, 6(2): 258-264, 1990.
- WHITE, M.J.D. - Cytological evidence on the phylogeny and classification of the Diptera. *Evolution*, 3: 252-261, 1949.
- WHITE, M.J.D. - *Animal cytology and evolution*. 3.ed. London: Cambridge University Press, 1973. 961 p.



VIII. AGRADECIMENTOS

Impossível agradecer aqui a todos pela convivência e colaboração, expresso, contudo, minha gratidão aos responsáveis pelas condições que tornaram possível a realização deste trabalho.

A minha mestra Prof^a. Dr^a. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, pela amizade, entusiasmo ao transmitir seus conhecimentos, incansável dedicação, brilhante orientação e pela confiança que depositou em meu desempenho, colocando o seu laboratório a minha disposição.

Ao Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (IBILCE), UNESP, pela acolhida e cessão de dependências e equipamentos necessários durante a realização deste trabalho.

A Superintendência de Campanhas Endêmicas (SUCEN) de São José do Rio Preto, na pessoa de seu diretor Sr. Francisco Chiaravalloti Neto, que possibilitou a realização deste trabalho.

Ao Insetário da SUCEN de Araraquara, na pessoa do biólogo responsável Eduardo Sterlino Bergo pelo apoio no fornecimento de exemplares e informações referentes ao *A. fluviatilis*.

A SUCEN de Marília, na pessoa de sua diretora Sr^a Maria Tereza M. Andregretti pela colaboração no fornecimento de exemplares de *Aedes*.



À bióloga da SUCEN de São José do Rio Preto, Sirle Abdo Salloum Scandar pela amizade, incansável ajuda no fornecimento de exemplares de **Aedes**, bem como de bibliografia referente à biologia do organismo e pelo interesse na concretização deste trabalho.

A todos funcionários da SUCEN de São José do Rio Preto, pela grande ajuda, paciência e valiosa colaboração na coleta dos insetos e, em especial, ao biólogo Rubens Pinto Cardoso Júnior, pelo interesse, apoio e colaboração.

Ao técnico da SUCEN de Araraquara, João Maurício Nóbrega da Silva Filho, pela paciência com que sempre nos atendeu e pela valiosa colaboração.

As amigas Mary M. Itoyama, Lilian M. Ravazzi, Ana Silvia Lapenta e Satiko N. Oyama pelo apoio, colaboração e companheirismo de todas as horas. Com vocês eu aprendi muito.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Tercília V. de A. Oliveira e a Prof^ª. Dr^ª. Doralice M. Cella pela atenção e valiosas sugestões na análise da Pro forma.

À Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Marcia A. Carareto, pelo interesse e orientação prestada na análise estatística.

Ao Prof. Dr. James R. Collemam, pela gentileza em revisar o Summary.

Ao Prof. Dr. Wladimir João Tadei, pela atenção e orientação na parte burocrática deste trabalho.



Aos Professores do Departamento de Biologia do IBILCE, pela amizade, incentivos, conhecimento e experiência profissional que proporcionaram meu amadurecimento científico.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, pela convivência amigável, estímulo e sugestões na realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Computação, Getúlio A. Salinas, Romildo O. Rodrigues, Guilherme Dworak e José Wanderlei da Silva pela disponibilidade e atenção.

Aos funcionários da Biblioteca do IBILCE, pela competência e dedicação no atendimento. Também, às bibliotecárias Olinda Vacari T. Lucchezi, Maria Helena Lima, Wilce Teresinha B. A. Soares, Gislaine L. Gameiro e Maria do Carmo Junqueira pelo empenho na obtenção das referências. Especial agradecimento deve ser feito a esta última pela orientação e revisão das referências bibliográficas.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação, Nanci O. de A. Pereira, Onilda N. de Oliveira Akasaki, Aguinaldo Lopes e Rosângela B. Simonato pela eficiência e disposição com que sempre nos atenderam.

Aos funcionários do Departamento de Biologia, Josué R. dos Santos, Laura N. A. Pinheiro, Paulo A. Maziero, Rosana S. de Souza, Sebastião Dias Barbosa e Simone C. Fernandes pelo apoio e colaboração nestes anos de convívio.

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação, pela agradável convivência diária e pela solidariedade nas horas alegres e nos



momentos difíceis.

À Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto - UNESP, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

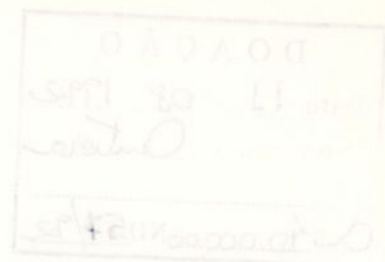
Aos meus pais, Albano e Arléti pelo imenso carinho e incentivos constantes e aos meus irmãos Débora, Júnior e ao Renato pelo apoio e pela grande amizade.

Ao companheiro Wilton, pelas idéias, energia, apoio e amor.

"Sem o esforço comum daqueles que estão perto de nós, seria mais difícil ultrapassar cada obstáculo."

"Para todos os seres humanos constitui um dever lutar por a melhor solução possível e sempre pronta para a cooperação com o que resta por fazer."

XXIII



"Para todos os seres humanos
constitui quase um dever pensar que o
que se tiver realizado é sempre pouco
em comparação com o que resta por
fazer."

(João XXIII)



